UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 1971-1972 Série U. N° 496

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

par

Victoria LEVADITOU

Recherches sur les osidases de l'insecte xylophage : Rhagium inquisitor L

Soutenue le 30 Novembre 1971

JURY : MM. les Professeurs J.-E. COURTOIS — Président

F. PERCHERON, P. BINET, C. CHARARAS — Examinateurs

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 1971-1972

Série U. N° 496

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

par

Victoria LEVADITOU

Recherches sur les osidases de l'insecte xylophage : Rhagium inquisitor L

Soutenue le 30 Novembre

JURY : MM. les Professeurs J.-E. COURTOIS — Président

F. PERCHERON, P. BINET, C. CHARARAS — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de mon Père

A ma Mère

En témoignage de mon admiration et de ma reconnaissance

Aux Miens

A mes Amis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550026_0016

A Monsieur le Professeur J. E. COURTOIS,
Professeur de Chimie biologique à l'Unité d'Enseignement
et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
de l'Université René Descartes, de Paris
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Officier de la Légion d'Honneur,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous confier le sujet de notre thèse, diriger nos recherches avec sollicitude et bienveillance et aujourd'hui, présider notre Jury de thèse.

En témoignage de notre profonde gratitude et respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON

Professeur à l'Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes, de Paris

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. BINET,

Professeur à l'Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de

l'Université de Paris-Sud,

qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

A Monsieur Constantin CHARARAS,
Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique,

qui nous a acceptée à son Laboratoire, nous a initiée à l'Entomologie, nous a manifesté tout au long de ce travail une constante bienveillance et a bien voulu juger notre thèse.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Mesdemoiselles

Jacqueline LABAT, Chargée de Recherches au C.N.R.S.

et

Marie-José FOGLIETTI, Maître-Assistante

En témoignage de notre gratitude et de notre amitié.

----- INTRODUCTION -----

Rhagium inquisitor L., insecte Coléoptère appartenant à la famille des Cerambycidae, montre une spécificité marquée pour les Pinus tout en attaquant également d'autres essences de Conifères.

Il existe plusieurs espèces de Rhagium parmi lesquelles nous pouvons signaler ici, à titre indicatif, Rhagium sycophanta Schr., espèce fréquente dans les régions alpines sur Conifères ; Rhagium bifasciatum F., insecte qui fait preuve d'une certaine polyphagie, puisque divers auteurs (DELLA BEFFA) (38) le signalent sur Abies, Pinus, Castanea, Fagus, Quercus ; et enfin Rhagium mordax Deg., signalé également par le même auteur sur Pinus, Castanea et Quercus. Ces deux espèces ont été également signalées par DAJOZ (33) lors d'une étude des Coléoptères du Chêne et du Hêtre dans la forêt de la Massane, mais se rencontrent aussi dans la forêt de Fontainebleau.

Quant à Rhagium inquisitor L., il s'agit d'un insecte long de 14 à 15 mm, aux élytres de couleur grise, pubescents, au pronotum ponctué ; la larve de couleur blanche peut atteindre 15 à 20 mm de long à la fin de son évolution. Son poids est d'environ 130 mg.

avec une capsule céphalique chitineuse et un large thorax brun.

Cet insecte est fort répandu dans la forêt de Fontainebleau, où il a été trouvé par CHARARAS en 1954 sur des troncs abattus ainsi que sur des sujets en déficience physiologique. Il s'agit d'un insecte qui ne provoque pas d'emblée de grands ravages dans les forêts, car il ne s'attaque pas aux sujets sains, mais aux arbres ayant perdu les caractéristiques physico-chimiques des arbres en sève (sujets abattus, souffreteux ou au stade de dégradation) ; c'est sur de tels sujets entre écorce et aubier que l'on trouve des larves pratiquant leurs galeries de nutrition, galeries larges de 5 à 12 mm sans aucune direction précise.

Du point de vue biologique, l'insecte adulte effectue sa ponte sur l'écorce, au printemps ; les larves exercent une première nutrition dans les tissus corticaux puis dans le liber ; lorsque cette nutrition est terminée et le développement larvaire achevé, chaque larve creuse entre écorce et bois, la loge nymphale où elle se transforme en nymphe puis en adulte. Ce dernier reste alors sur place et ne sortira que l'année suivante.

La question de la préférence des insectes xylophages

pour les sujets en déficience physiologique a été étudiée en détail par CHARARAS (10) qui précise que les espèces secondaires s'attaquent à des sujets ayant subi des modifications de leur vitalité, avec abaissement de la pression osmotique et modification du suc cellulaire des faisceaux du liber.

Le cas de Rhagium inquisitor L. est typique car, outre les sujets en déficience physiologique, l'insecte s'attaque également à des sujets complètement dégradés et en voie de décomposition.

Cette particularité a attiré notre attention et sur les conseils des Professeurs J. E. COURTOIS et C. CHARARAS, nous avons entrepris une étude de l'équipement enzymatique afin de déterminer les enzymes qui interviennent dans la digestion du bois.

En dehors des travaux de DESCHAMPS (41) qui a consacré une étude à cet insecte et qui a précisé l'existence d'une cellulase, il n'a jamais été réalisé de recherches biochimiques pour cet insecte. Lorsqu'il a étudié la cellulase, DESCHAMPS (1953) a employé des méthodes bien différentes des nôtres. Les autres enzymes qui interviennent dans la digestion (diverses enzymes agissant sur les oligosaccharides et hétérosides, ainsi que sur des polysaccharides) n'ont fait l'objet d'aucune

étude jusqu'ici et c'est ce qui nous a amenée à réaliser ce travail.

L'exposé de notre travail sera divisé en quatre parties :

- la première sera consacrée à la description des principales techniques utilisées au cours de ces recherches ;

- l'étude anatomo-physiologique du tube digestif de la larve de Rhagium inquisitor fera l'objet de la deuxième partie ;

- les troisième et quatrième parties seront consacrées à l'étude de l'équipement enzymatique du tube digestif de la larve avec, lors de la quatrième partie, une étude plus détaillée de l'activité polygalacturonasique.

Nous avons commencé ce travail à l'Hôpital Laënnec sous la direction de Monsieur le Professeur J. E. COURTOIS qui nous a acceptée avec bienveillance et a guidé nos recherches, qui se sont accomplies dans son Laboratoire de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie, avec une grande sollicitude.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer de nouveau notre profonde reconnaissance et notre sincère attachement.

Nous adressons toute notre gratitude à Monsieur le Professeur F. PERCHERON qui a bien voulu juger notre travail.

Nous saisissons l'occasion qui nous est offerte de remercier et d'exprimer notre profonde gratitude à Monsieur CHARARAS, Directeur de Recherches au C.N.R.S.,

qui nous a acceptée à son Laboratoire pour nous initier à l'Entomologie et nous a manifesté son intérêt tout au long de ce travail.

Notre vive reconnaissance va également à Monsieur le Professeur P. BINET, qui, avec bienveillance, a accepté de faire partie de notre Jury.

Nous tenons à exprimer également ici nos sincères remerciements à Mademoiselle J. LABAT, Chargée de Recherches au C.N.R.S. qui nous a encouragée au début de ce travail et nous a aidée très amicalement à accomplir une grande partie de notre thèse.

Qu'elle trouve ici un témoignage de notre gratitude et de notre amitié.

Notre profonde gratitude va également à Mademoiselle M. FOGLIETTI, Maître-Assistante, qui a contribué à faciliter nos recherches au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie et a bien voulu corriger nos manuscrits.

En cet endroit, nous saisissons l'occasion qui nous est offerte de la remercier de l'aide particulièrement précieuse qu'elle nous a apportée.

Nous éprouvons également une vive reconnaissance à l'égard de Monsieur F. PETEK, Maître de Recherches au C.N.R.S.

qui nous a fait profiter de sa grande compétence en enzymologie tout au long de notre séjour au Laboratoire de Chimie Biologique.

Nos remerciements vont enfin également à Madame LAURANT-HUBE, Biologiste-Adjointe au C.N.R.S., qui nous a amicalement aidée au début de notre travail.

PREMIERE PARTIE

MATERIEL ET METHODES

-o-o-o-

PROTOCOLE DES ESSAIS

-o-o-o-o-o-

A - PREPARATION DES SUBSTRATS

I - OLIGOSACCHARIDES

Nous avons utilisé des échantillons commerciaux de saccharose et tréhalose, dont la pureté a été contrôlée, par chromatographie sur papier.

Afin d'étudier l'activité pectinasique, nous avons été amenée à préparer les oligomères de l'acide D-galacturonique (Gal U A) (48) ainsi qu'un dérivé d'oxydation de celui-ci, l'acide mucique.

1) Oligomères de l'acide galacturonique

5 grammes de pectine de Pomme "Unipectine" sont chauffés à reflux au bain-marie bouillant avec de l'acide sulfurique N (500 ml) pendant 3 heures.

L'hydrolysat est neutralisé par le carbonate de baryum, puis désionisé par passage sur une colonne d'Amberlite IR-120 (H^+). La colonne est lavée à l'eau jusqu'à ce que l'éluat ne donne plus de coloration verte avec le réactif à l'anthrone. L'éluat est concentré sous pression réduite, puis séché sous vide.

L'hydrolysat ainsi obtenu (1,5 g) contient des oses neutres (Gal, Ara) et les acides mono, di, tri et tétragalacturoniques.

Il est chromatographié sur une colonne de 40 ml d'Amberlite (CG 400) sous forme formiate. La colonne est d'abord éluée à l'eau (500 ml) pour éliminer les oses neutres puis avec un gradient exponentiel d'acide formique 0-N. Ce gradient est réalisé grâce à un flacon mélangeur à volume constant, contenant 500 ml d'eau et alimenté par un flacon de réserve contenant 2 litres d'acide formique 2 N. L'éluat est recueilli par fractions de 10 ml. Les pics d'élution sont localisés par enregistrement polarimétrique.

Les fractions correspondant à chaque pic sont agitées avec de l'éther pour éliminer une partie de l'acide formique, puis concentrées sous pression réduite en présence d'alcool isopropylique. Chaque fraction est purifiée par chromatographie sur papier Whatmann n° 3 MM (solvant III).

Nous obtenons ainsi les acides :

- Digalacturonique (Rf/Gal UA = 0,20)
- Trigalacturonique (Rf/Gal UA = 0,05)
- Tétragalacturonique

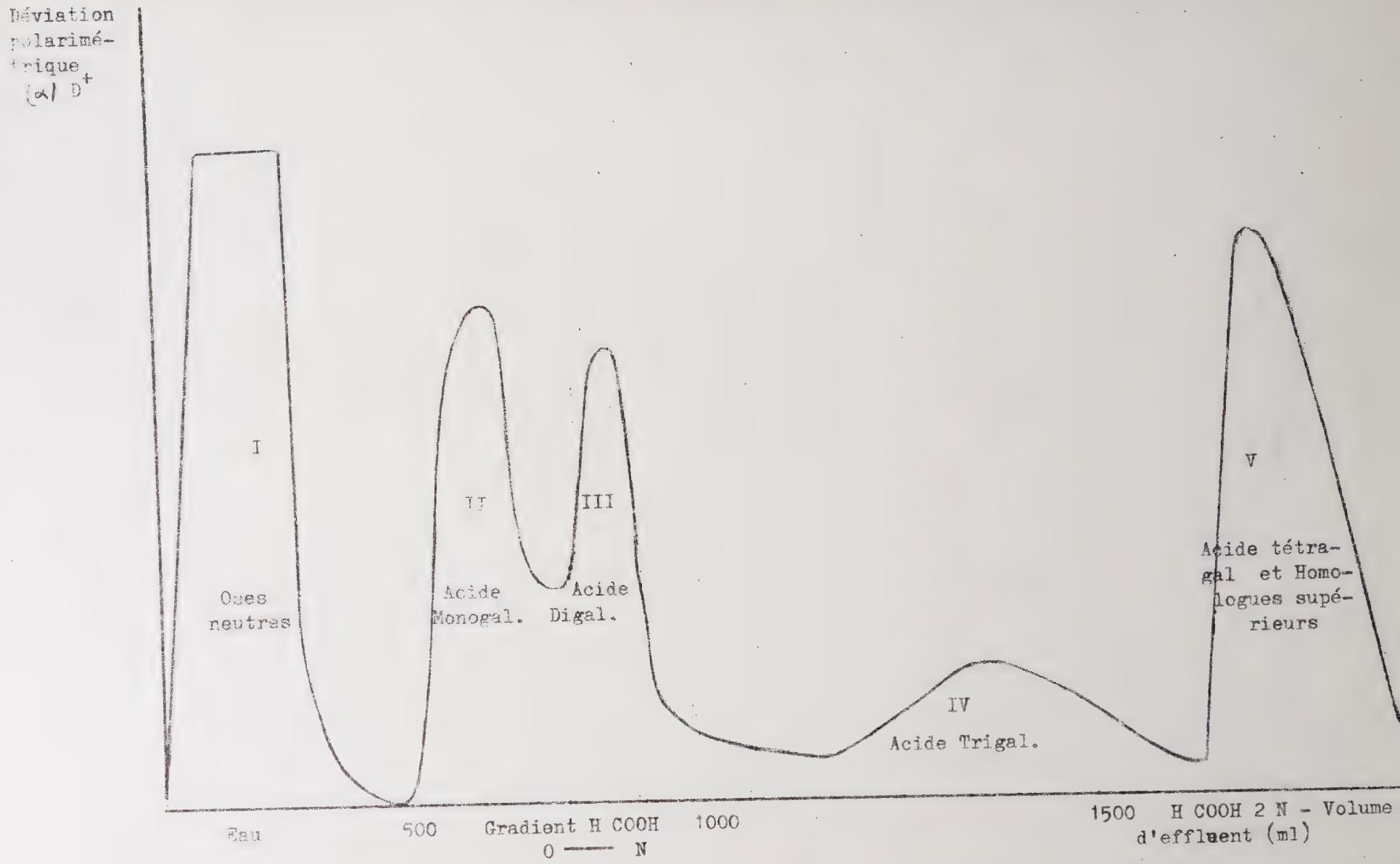


FIGURE n° 1

COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT PARTIEL DE PECTINE

2) Acide mucique

Nous avons préparé l'acide mucique (galactarique) selon la technique décrite par Mc CREADY (66).

5 grammes d'acide D-galacturonique sont dissous dans 100 ml d'eau de Brome saturée. La solution est laissée pendant deux heures à la température du laboratoire, puis le brome est chassé dans un courant d'air. Au fur et à mesure de l'évaporation, l'acide mucique cristallise sous forme de petites tablettes.

Les cristaux sont filtrés, lavés avec de l'eau et séchés à l'air. L'acide mucique est insoluble dans l'eau et optiquement inactif (F = 214°).

II - POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides sont pour la plupart :

- soit des échantillons commerciaux
- soit des échantillons provenant de la collection du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie.
- L'hémicellulose nous a été obligeamment fournie par Monsieur A. ROUDIER.

D'autre part, nous avons été amenée à préparer certains polysaccharides comme nous l'exposerons par la suite.

1) Pectine

Nous avons utilisé la pectine de Pome "Unipectine" qui libère par hydrolyse acide de l'acide Galacturonique, du Galactose et de l'Arabinose. Sa teneur en Acide Galacturonique est de 70 %.

2) Acide pectique

Nous l'avons préparé à partir de la pectine de Pomme selon la technique décrite par Mc CREADY (67).

10 grammes de pectine de Pomme sont humectés avec de l'alcool à 95°. Puis un litre d'eau à 25° est ajouté rapidement, sous agitation.

L'agitation est maintenue jusqu'à dissolution complète. Puis environ 60 ml de soude N sont ajoutés pour amener le pH à 12.

La saponification des liaisons méthyl-ester s'effectue à la température du laboratoire pendant une heure.

Par addition, goutte à goutte, de 10 ml d'acide chlorhydrique concentré, le pectate de sodium est précipité sous forme d'acide pectique.

L'acide pectique forme un gel qui est filtré puis trituré dans deux volumes d'éthanol à 50°.

Le lavage avec de l'éthanol à 50° est poursuivi jusqu'à élimination de tous les ions chlore.

L'acide pectique est ensuite lavé avec de l'éthanol à 95°, filtré et séché sous vide.

Cet acide pectique contient 4,6 µ moles d'acide galacturonique par mg.

3) Acide pectique réduit (47)

Nous l'avons préparé par réduction de l'acide pectique à l'aide du borohydrure de potassium. Seule la fonction hémiacétalique libre des extrémités galacturoniques terminales du polysaccharide est attaquée par ce réactif.

Nous avons utilisé un large excès de borohydrure par rapport à la quantité théorique qui est 250 mg par mole réductrice.

10 grammes d'acide pectique sont dissous dans un litre d'eau à l'aide de soude N, ajoutée goutte à goutte, sous agitation mécanique. Puis 3 grammes de borohydrure de potassium sont ajoutés peu à peu. Le mélange est soumis à une agitation mécanique pendant 72 heures.

La solution est alors neutralisée par de l'acide chlorhydrique N. L'acide pectique réduit, précipite. Le gel formé est lavé successivement avec de l'alcool à 50°, puis à 95° jusqu'à élimination de tous les ions chlore.

Après un dernier lavage à l'acétone, le précipité est séché sous vide. L'acide pectique réduit contient 4,4 µ moles d'acide galacturonique/mg.

4) Glucomannane

Ce substrat a été préparé selon le protocole de DALOUL (34). 100 grammes de Salep de Turquie sont pulvérisés finement au broyeur électrique "Turmix". La poudre est ensuite soumise à une extraction par agitation mécanique pendant 24 heures à + 4° dans vingt parties d'eau.

Après centrifugation, le surnageant est précipité par un volume égal d'éthanol absolu. Le précipité séparé par filtration sous vide est repris par l'eau. La solubilisation est effectuée par mixage au "Turmix".

Après centrifugation, le surnageant est à nouveau traité par un égal volume d'éthanol absolu. Les reprises par l'eau et centrifugations sont répétées trois fois.

La solution du dernier précipité est dialysée contre de l'eau distillée pendant 24 heures puis précipitée par un égal volume d'éthanol absolu. Le précipité est séparé par filtration sous vide, puis séché.

Ce substrat est formé d'unités β glucopyranosyl et β mannopyranosyl alternant le long d'une chaîne où elles

se trouvent reliées par des liaisons glycosidiques (1 ⟶ 4). La glucomannane de Salep renferme environ 3 parties de mannose pour une de glucose.

5) Laminarine

Ce polysaccharide (laboratoire KOCH-LIGHT) est constitué d'unités de β-glucopyranose reliées par des liaisons (1 ⟶ 3).

6) Amidon

Nous avons employé l'amidon de blé traité de la façon suivante :

0,15 g d'amidon sont délayés dans 2,5 ml d'eau bidistillée. Le mélange est tiédi, additionné de 12,5 ml d'eau bouillante, puis porté à ébullition pendant 20 à 30 secondes. Ce composé d'amidon se conserve quelques jours.

Nous avons employé cette méthode de traitement de l'amidon afin d'obtenir directement des chiffres exprimés en unités Somogyi, ce que l'amidon soluble ne nous permet pas d'obtenir.

7) Cellulose gonflée (Swollen-cellulose de HAILIWELL(53)

La cellulose est constituée d'unités de β -gluco-pyranose reliées par des liaisons (1 ⟶ 4). Un pré-traitement de la cellulose par des acides (PO_4H_3 90 %) accroît la réactivité chimique.

Ce substrat nous a été fourni par le laboratoire de Chimie Biologique de l'Hôpital LAENNEC.

8) Carboxyméthylcellulose sodique ou blanose (C.M.C.)

La carboxyméthylcellulose utilisée est la blanose R 195 S (NOVACEL). Elle est obtenue par action de l'acide monochloracétique sur une alcalicellulose. Une partie des fonctions alcool primaire supportées par les carbones 6 des unités glucose se trouve substituée ; le degré de substitution varie selon le mode de fabrication et la matière première ; celui des échantillons utilisés est de 0,70.

9) Hydroxyéthylcellulose (HEC)

IWASAKI, TOKUYASU et FUNATSU (56) ont les premiers employé l'HEC comme substrat. L'HEC est un dérivé non polaire. La viscosité des solutions n'est pas modifiée par le pH et elle est très peu influencée par la force

ionique du milieu.

Ces trois raisons nous font préférer ce substrat à la C.M.C.

La poudre de cellulose Whatmann est traitée en milieu alcalin par l'oxyde d'éthylène.

$$\text{cell}\ (OH)^3 + n\ CH_2 \overset{O}{\triangle} CH_2 \xrightarrow{NaOH} \text{cell}\begin{cases} OH\ (3 - n) \\ (O\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH)n \end{cases}$$

Cette préparation est délicate, car plusieurs types de réaction peuvent se produire simultanément. Nous avons utilisé l'HEC préparée selon la technique mise au point par COURTOIS et BUI KHAC DIEP (21).

10) Hémicellulose

Nous avons utilisé l'hémicellulose B_7 que nous a obligeamment fournie Monsieur ROUDIER.

Elle est extraite du bois de Pin maritime des Landes *Pinus maritima* (86) (97) (98), et contient environ 20 % d'une glucuronoaraboxylane, 45 % d'une glucomannane et 4 à 5 % d'une glucuronoarabogalactane.

B - PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Les larves de Rhagium inquisitor ont été récoltées par Mr C. CHARARAS dans la forêt de Fontainebleau aux mois d'avril et de septembre, sur des troncs de Conifères récemment abattus.

Les larves sont lavées avec une solution stérile de chlorure de sodium à 9 g pour 1000 afin de se débarasser de tout corps étranger, puis séchées sur papier filtre ; elles sont ensuite broyées au mortier à sec puis additionnées de 100 ml de solution de chlorure de sodium à 9 g pour 1000, pour 10 g de larves. Le broyat est centrifugé pendant 15 mn à 6000 tours/min. en appareil réfrigéré. Broyage et centrifugation sont répétés trois fois.

Le surnageant est constitué par l'extrait aqueux direct, c'est-à-dire contenant les enzymes directement extractibles par l'eau. Cet extrait est soumis à la dialyse dans un boyau de nylon contre une solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000 pendant trois jours à + 4° afin d'éliminer les sucres réducteurs et en particulier le tréhalose, glucide trouvé en quantité importante chez les Insectes.

Le boyau de nylon est utilisé de préférence à celui de cellophane qui risque de fixer les cellulases et d'être détruit.

Nous avons cherché à extraire du culot de centrifugation par une série de congélations et décongélations successives les enzymes intracellulaires non directement extractibles par l'eau. Les structures cellulaires sont alors disloquées et les enzymes intracellulaires deviennent extractibles.

Cette méthode est basée sur le fait que les enzymes existent très souvent dans les tissus sous deux formes :

a) des lyo-enzymes directement extractibles par l'eau ;

b) des desmo-enzymes liées aux cellules.

L'enzyme peut exister dans le même tissu sous les deux formes.

Par ultra-centrifugation différentielle, il a été possible de localiser des osidases à l'intérieur de formations cellulaires (mitochondries et microsomes).

CONCHIE, HAY et LEVY (18) ont pu ainsi isoler la β-glucuronidase de foie et de rein de souris blanches dans les granules cytoplasmiques, alors que la β-glucuronidase de la rate est trouvée à l'état libre dans le cytoplasme.

Le résidu de centrifugation provenant de l'extraction précédente est mis en suspension dans 5 ml de sérum physiologique, additionné de deux gouttes de chloroforme. Puis, il est soumis à une congélation rapide à - 20°C, suivie d'une décongélation à la température du laboratoire. Cette opération est répétée environ huit fois. Il ne faut pas trop multiplier ces séries de congélation-décongélation car il y a risque de dénaturation des enzymes.

L'extrait est séparé par centrifugation. Le résidu de centrifugation est épuisé trois fois par 3 ml de solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000. La totalité de l'extrait est diluée avec la solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000 de façon à ce que 10 ml correspondent à 1 gramme de larves. Les deux extraits sont conservés à - 20°C en présence de deux ou trois gouttes de chloroforme.

Remarque :

Au cours de ce travail, nous nommerons : "extrait A" l'extrait aqueux direct. Il est constitué par les enzymes directement extractibles qui pourront être soit d'origine extracellulaire (sécrétion du tube digestif), soit d'origine cytoplasmique et libérées par éclatement des membranes cellulaires pendant le broyage des tissus.

L'"extrait B" est constitué par l'extrait aqueux obtenu après congélations et décongélations successives. Il est constitué par les enzymes restant encore à l'intérieur des cellules et libérées par éclatement.

Pour l'étude des cellulases, mannanase et laminarinase, nous avons utilisé les extraits non dialysés.

C - PROTOCOLE OPERATOIRE

I - COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL

Les oligosaccharides sont à une concentration M/50 dans le milieu.

Pour les polysaccharides, nous avons utilisé les quantités suivantes :

- Hémicellulose, carboxyméthylcellulose, cellulose gonflée : 4 mg par essai.
- Pectine d'oeillet et de pomme, glucomannane et laminarine : 1 mg par essai.
- Amidon : 0,5 ml de substrat préparé selon la technique décrite précédemment.
- H.E.C. : 160 mg par essai (dosage viscosimétrique)

II - PROPORTIONS RELATIVES TAMPON-ENZYME

A 0,5 ml de solution enzymatique correspondant à 50 mg de larves, nous ajoutons 0,25 ml de tampon phosphate disodique-acide citrique et 0,5 ml de substrat.

Le volume final est donc de 1,25 ml. Nous préparons pour chaque série d'essais deux témoins : un de l'enzyme et un du substrat.

III - pH ET TEMPERATURE

Les essais sont effectués au pH optimum de chacune des enzymes et à + 37°C.

IV - DETERMINATION DU POUVOIR REDUCTEUR

Nous avons, tout au long de ce travail, employé, pour doser les groupements réducteurs libérés après chaque réaction enzymatique, la méthode réductimétrique de SOMOGYI (91) et NELSON (73).

Le dosage s'effectue en deux temps :

1) Les glucides réduisent à l'ébullition le réactif cuproalcalin de SOMOGYI.

2) L'oxyde cuivreux réduit le réactif arsénio-molybdique de NELSON en donnant des dérivés molybdeux de coloration bleue.

La détermination du pouvoir réducteur est effectuée sur des prises d'essais contenant entre 50 µg et 150 µg de substances réductrices exprimées en glucose.

Les essais témoins sont soustraits des résultats obtenus par le dosage.

D - TECHNIQUES ANALYTIQUES

I - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons utilisé la chromatographie descendante sur papier Schleicher et Schüll à 2043 Mgbl afin de suivre l'évolution des hydrolyses enzymatiques et caractériser les produits libérés, évaluer le degré de purification de certains produits et les identifier par rapport à un témoin.

Nous avons aussi été amenée à utiliser la chromatographie préparative sur papier Whatmann n° 3 MM pour purifier les oligomères de l'acide galacturonique.

Mélanges solvants

Nous utilisons essentiellement des solvants monophasiques :

Solvant I : Isopropanol 6
Méthyl-éthyl-cétone ... 5
Acétate d'éthyle 3
n-butanol 2
eau ..... 6 en volumes

Ce solvant sépare très bien les di et trisaccharides.

Solvant II : n-butanol 9
Pyridine 5
Eau ..... 4 en volumes

Ce solvant sépare bien en 24 heures les mono et les disaccharides sans entraîner les acides uroniques.

Solvant III : Acétate d'éthyle 8
n-butanol 9
Pyridine 7
Eau ..... 5 en volumes

Ce solvant donne une meilleure séparation des oses neutres que le solvant II.

Solvant IV : Acétate d'éthyle 18
Acide acétique 3
Acide formique 1
Eau ..... 4 en volumes

Ce solvant sépare les acides uroniques.

Révélateurs

- Révélateur à la β -naphtyllamine et au thymol de PETEK (80)

β-naphtylamine ..... 0,10 g

Thymol ..... 1,00 g

Acide phosphorique 80 % ..... 2 ml

Ethanol à 80 % ..... 150 ml

Après pulvérisation du réactif, le papier est chauffé à + 105°C environ jusqu'à apparition des taches.

L'avantage de ce révélateur est la diversité des colorations obtenues avec les différents oses et saccharides : les pentoses se colorent en brun rouge, les cétoses en jaune, les hexoses en marron et les composés uroniques en rouge.

Les oligosaccharides donnent en général des colorations intermédiaires entre celles données par leurs constituants. Seul le tréhalose n'est pas révélé à cause de la stabilité de la liaison osidique qui demeure pratiquement inattaquée dans les conditions opératoires de la révélation.

- Révélateur au nitrate d'argent

Réactif A : $AgNO_3$ .....3 g

Eau .....4 ml

Acétone .....196 ml

Réactif B : NaOH ..... 2 ml

Méthanol ..98 ml

Après pulvérisation avec le réactif A, le chromatogramme est séché à l'air libre. Il est ensuite pulvérisé avec le réactif B. Tous les monosaccharides et oligosaccharides sont alors révélés en noir.

Après coloration du fond du chromatogramme par lavage avec une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium à 30 %, puis avec l'eau les chromatogrammes peuvent être conservés.

L'inconvénient de ce révélateur est l'uniformité de la coloration des taches et son manque de spécificité car il réagit avec les polyols.

- Révélateur à l'oxalate d'aniline (77)

  n-butanol ..... 80 ml

  Ethanol ..... 50 ml

  Aniline ..... 1 ml

  Eau distillée ..... 40 ml

  Acide oxalique ..... 2 g

Ce réactif est utilisé pour la révélation des aldoses O-méthylés qui donnent une coloration rouge sur fond blanc.

II - HYDROLYSE CHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES

Hydrolyse chimique totale

Nous l'avons utilisée pour identifier les constituants de la pectine, de l'acide pectique et de l'hémicellose utilisés comme substrats. Les corps libérés sont caractérisés par chromatographie sur papier.

Technique

Elle s'effectue à 100°C pendant dix heures dans H_2SO_4 2N en ampoule scellée (5 mg de polysaccharide dans 0,5 ml d'acide). L'hydrolysat est neutralisé par le carbonate de baryum et filtré. Les ions baryum sont éliminés par agitation avec une résine échangeuse de cations, l'Amberlite IR 120, sous forme H^+.

III - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Nous avons utilisé cette technique essentiellement pour préparer les oligomères de l'acide galacturonique.

Nous employons une résine échangeuse d'anions fortement basique (Amberlite CG 400 en cycle formiate) permettant la fixation et la séparation d'acides faibles.

Activation

Après un séjour suffisant dans l'eau, la résine prend son gonflement maximum. Puis son activation est effectuée par des lavages successifs avec de la soude 2N, de l'eau distillée jusqu'à neutralité, de l'acide chlorhydrique 2N et de l'eau jusqu'à neutralité.

Mise en cycle formiate.

Nous utilisons le protocole décrit par PAQUIN (76). La colonne de résine est traitée successivement par vingt fois son volume de :

- solution de formiate de sodium 3 M
- Mélange à parties égales de solution de formiate, de sodium 3 M et d'acide formique 6 M
- Acide formique 6 M

Puis elle est lavée avec de l'au distillée jusqu'à neutralité de l'éffluent.

IV - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

- Réaction au carbazole-acide sulfurique de DISCHE (43)

Cette technique nous permet de doser l'acide galacturonique dans l'acide pectique préparé.

Réactifs

1) Acide sulfurique concentré exempt de substances oxydantes (MERCK)

2) Solution de carbazole

Carbazole ..... 0,10 g

Alcool absolu ..... q. s. p. 100 ml

La solution se conserve un mois à + 4°C

3) Solution témoin d'acide D-galacturonique à 100 µg/ml

Coloration

A 1 ml de la solution à doser (5 à 100 µg d'acide galacturonique) ajouter lentement et régulièrement 6 ml d'acide sulfurique, les tubes étant maintenus dans un bain d'eau glacée. Porter 20 minutes au bain-marie bouillant et refroidir sous eau courante.

Ajouter 0,2 ml de solution de carbazole. Agiter; laisser la coloration se développer pendant 3 heures à l'obscurité. L'intensité de la coloration pourpre obtenue est mesurée à 530 nm.

V - DOSAGE DES PROTEINES

La méthode employée pour le dosage des protéines est celle de ZAMENHOF (101) qui est une adaptation en microméthode de celle de SAKAGUCHI basée sur la réaction du Biuret.

Cette méthode permet d'éviter les erreurs provoquées par l'absorption due aux DNA lors de l'expression de l'activité spécifique des protéines enzymatiques.

Réactifs

1er réactif dit "bleu"

40 ml de solution aqueuse de sulfate de cuivre à 1 % sont ajoutés petit à petit à 150 ml d'une solution aqueuse de soude à 40 %. La solution doit être limpide sinon elle est filtrée sur verre fritté.

2ème réactif dit "blanc"

A 150 ml de soude à 40 %, on ajoute 40 ml d'eau distillée.

Technique

1 ml d'eau distillée et 1 ml de réactif bleu sont ajoutés à 1 ml de solution contenant de 50 à 100 µ g de protéine et environ 500 µ g de DNA.

Après 20 minutes de repos, l'absorption est lue au spectrophotomètre à 310 et 390 nm contre un témoin qui ne contient pas de protéines et préparé dans les mêmes conditions expérimentales. La correction de l'absorption du DNA est réalisée en répétant les essais avec le réactif blanc.

La différence entre les deux lectures (à 310 et 390 nm) obtenue avec la série des essais traités avec le réactif blanc est déduite de la différence obtenue de la

même façon avec la série des essais traités avec le réactif bleu.

Les valeurs obtenues sont comparées avec celles données par une protéine standard, l'albumine bovine, en poudre, fraction V, de la Nutritional Biochemical Corporation.

Nous avons réalisé différentes dilutions de cette protéine standard : 50 - 100 - 200 - 400 - 800 µg/ml. 1 ml de chacune des dilutions est mis dans des tubes de deux séries de cinq tubes d'essais.

Après 20 minutes de repos, les absorptions sont lues à 310 et 390 nm au spectrophotomètre.

SERIE BLEUE

N° des tubes	1	2	3	4	5	témoin bleu
Protéines en µg/ml	50	100	200	400	800	0
Solution	1	1	1	1	1	-
H_2O dist. (ml)	1	1	1	1	1	2
Réactif bleu (ml)	1	1	1	1	1	1

SERIE BLANCHE

N° des tubes	1	2	3	4	5	témoin blanc
Protéines en µg/ml	50	100	200	400	800	0
Solution	1	1	1	1	1	-
H_2O dist. (ml)	1	1	1	1	1	2
Réactif blanc (ml)	1	1	1	1	1	1

VI - MESURE DE VISCOSITE

La technique est celle préconisée par COURTOIS et BUI KHAC DIEP (21) afin de tester l'activité des préparations enzymatiques sur HEC.

Nous utiliserons un viscosimètre de type COUETTE (appareil Rotovisko).

Cet appareil est constitué de deux cylindres coaxiaux dont l'un est fixe et l'autre en rotation. La solution remplit l'espace laissé entre les deux cylindres.

Un couple de rotation doit être appliqué au cylindre intérieur afin de le faire tourner à une vitesse donnée. La valeur du couple dépendra de la viscosité de la solution. Le moment de rotation transmis au cylindre intérieur est mesuré sous la forme d'une déviation de l'aiguille d'un galvanomètre (déviation d'autant plus faible que la viscosité est élevée).

L'appareil est thermostaté à + 25°C. La lecture est effectuée après une rotation de quinze secondes strictement observée lors de tous les essais afin d'éliminer la diminution de viscosité due à l'échauffement du liquide lors de la rotation.

Calculs

La viscosité absolue η (en centipoises) est donnée par la formule :

$$\eta = U \times S \times K$$

U = facteur de vitesse utilisée

S = déviation du galvanomètre

K = constante de l'appareil

Nous utilisons pour les calculs la viscosité spécifique

$$\eta Sp = \frac{\eta - \eta_o}{\eta_o}$$

η = viscosité de la solution

η_o = viscosité de l'eau

$$\eta Sp = \frac{USK - US_oK}{US_oK}$$ soit en simplifiant,

$$\eta Sp = \frac{S - S_o}{S_o}$$

Pour la commodité d'expression des résultats, nous calculons le pourcentage de diminution de viscosité (Dim. Visc.) ; celui-ci étant obtenu grâce à la formule suivante :

$$\text{Dim. Visc.} = 100 - \left(\frac{Spt}{Sp_o} \times 100\right)$$

ηSpt étant la viscosité spécifique après un temps d'incubation (30 min pour nos essais).

ηSp_o étant la viscosité au temps 0.

Unités

Nous utiliserons les unités cellulasiques proposées par BUI KHAC DIEP (21). Quantité d'enzyme qui provoque une diminution de viscosité de 1 % en 1 minute dans les conditions expérimentales.

Rapporté à 1 g de préparation enzymatique

$$U/g = \frac{\text{Dim. Visc.}}{t \times p}$$

(poids insecte en g dans 1 ml du milieu réactionnel)

-o-o-o-o-o-

DEUXIEME PARTIE

ETUDE ANATOMO-PHYSIOLOGIQUE DU TUBE DIGESTIF DE LA LARVE DE RHAGIUM INQUISITOR

-o-o-o-o-o-

A - LE TUBE DIGESTIF

I - METHODOLOGIE

Les larves de Rhagium inquisitor ont tété prélevées à différentes périodes, c'est-à-dire en été, en automne et en hiver.

Pour l'étude anatomique, nous dissèquons les larves dont nous fixons le tube digestif pendant 24 heures au Bouin alcool (solution alcoolique d'acide picrique additionnée d'acide acétique et de formol), puis l'acide picrique est éliminé par bains prolongés dans l'alcool à 70° ; il est à noter que l'élimination de l'acide picrique se trouve accélérée lorsque l'on ajoute du carbonate de lithium à l'alcool dans la proportion de 500 mg pour 100 ml. Après un dernier lavage complet à l'alcool à 70°, il est possible de procéder à la coloration au glychémalun ou à toutes autres colorations spécifiques des noyaux comme l'Hémalun Masson ou le Trichrome de Prenant, après avoir pris soin de ramener la préparation dans l'eau distillée.

Ces trois colorations, qui donnent des résultats comparables du point de vue anatomique, ont été utilisées ; pour la méthode au glychémalun que nous avons le plus souvent employée, une coloration de 4 minutes s'avère

suffisante et l'excès de colorant est éliminé par l'alcool chlorhydrique puis par un lavage prolongé dans l'eau pure. Une coloration plus intense des noyaux est obtenue par adjonction de trois à quatre gouttes d'ammoniaque et l'on procède ensuite à la coloration du cytoplasme par l'érythrosine à 1 %.

La coloration proprement dite étant terminée, on procède à la deshydratation de la préparation par passage dans des bains successifs d'alcool à 70°, d'alcool à 90°, d'alcool absolu, de toluène et l'on termine par un montage au baume du Canada.

A l'examen microscopique, les noyaux apparaissent en violet foncé sur le fond rougeâtre (cytoplasme) de la préparation.

En ce qui concerne la méthodologie relative aux coupes histologiques, après dissection, le tube digestif est fixé soit au Bouin alcool ci-dessus mentionné, soit au Zenker dont les formules sont les suivantes :

Bouin	alcool à 80°	150 ml
	formol à 40 %	60 ml
	acide acétique pur cristallisable	15 ml
	acide picrique	1 g

Zenker

chlorure mercurique	5 g
bichromate de potassium	2,5 g
sulfate de sodium	1 g
eau distillée	100 ml
acide acétique	5 ml

Lorsque le fixateur utilisé est le Bouin alcool, on procède à la fixation et à l'élimination de l'acide picrique comme lors d'une étude anatomique ; dans le cas du Zenker, la fixation dure dix heures et le chlorure mercurique est éliminé par un bain de 10 min dans l'alcool iodé suivi d'un lavage prolongé à l'eau pour éliminer le bichromate de potassium.

Quel que soit le fixateur employé, Bouin ou Zenker, on procède après les lavages appropriés à une deshydratation complète par bains successifs dans l'alcool à 70°, l'alcool à 90°, l'alcool absolu, l'alcool butylique et après inclusion dans la paraffine, on procède à des coupes dont l'épaisseur moyenne se situe à 5 et 7,5 µ.

II - ETUDE ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DU TUBE DIGESTIF

C'est au stade larvaire que Rhagium inquisitor L. pratique une nutrition très intense en utilisant les matières qui se trouvent entre écorce et bois et même dans la masse du bois.

Si en début d'attaque (premiers stades larvaires), le biotope conserve certains constituants glucidiques à des valeurs voisines de celles des sujets en sève, en revanche le bois des arbres abattus se décompose rapidement.

Nous donnerons ici un aperçu sommaire de l'anatomie du tube digestif.

Le tube digestif débute par un oesophage très court, de forme tubulaire qui se renfle à sa base pour former une poche gastrique volumineuse, présentant des replis et des boursouflures rappelant l'aspect des caecum observés chez d'autres insectes. En réalité, il s'agit de renflements de la poche gastrique ou plus exactement de cryptes dans lesquelles on trouve divers microorganismes, notamment des levures. A la suite de cette poche gastrique volumineuse, vient l'intestin moyen de forme tubulaire, plus rétréci avec la poche gastrique. Dans la partie antérieure, nous observons des cryptes fines, morphologiquement différentes de celles de la poche gastrique, puis une zone dépourvue de cryptes.

Vers l'extrémité terminale de l'intestin moyen, nous observons un rétrécissement appelé valvule pylorique et à cet endroit viennent s'insérer les tubes de Malpighi. A partir de la valvule pylorique commence l'intestin

postérieur d'aspect tubulaire, recourbé dans la cavité générale. Vers la portion terminale de l'intestin postérieur, nous observons un renflement marqué par une membrane appelée membrane cryptosolénique, sous laquelle pénètrent les tubes de Malpighi.

Du point de vue histologique et physiologique, l'oesophage ne présente aucune activité secrétrice puisque l'on observe un intima sans cellules participant à la secrétion et à la digestion. L'oesophage sert uniquement au transit du bois. Par contre, la poche gastrique volumineuse joue un rôle très important dans la digestion du bois.

Histologiquement, nous observons au niveau de la poche gastrique un épithélium à aspect vacuolaire granulé avec régénération vers la lumière du tube digestif, ce qui prouve le rôle joué par la digestion. En plus, l'examen du suc gastrique de la poche gastrique nous montre la présence de divers microorganismes (bactéries et levures) qui participeraient en partie à la digestion.

Le bois séjourne assez longtemps dans la poche gastrique puisque l'alimentation avec du bois coloré au carmin d'indigo nous montre un état stationnaire de 5 à 6 heures dans la portion de la poche gastrique.

Sous l'action de diverses enzymes secrétées dans la

poche gastrique, le bois est progressivement granulé puis liquéfié et transite peu à peu dans l'intestin moyen. Dans celui-ci, nous observons également une forte activité secrétrice.

Quant à l'action de l'intestin postérieur dans la digestion, sa structure histologique ne permet pas de lui attribuer un rôle important. La plupart des auteurs nient d'ailleurs que l'intestin postérieur soit capable de digérer des aliments, mais il pourrait parachever l'absorption de certaines substances. WIGGLESWORTH (1931) (99) pense que chez certains insectes, l'épithélium de l'intestin postérieur absorberait l'eau, asséchant ainsi les excréments et servant à la régulation de l'équilibre sanguin.

Cette dernière hypothèse avait surtout été retenue pour certains Trichoptères Lépidoptères mais dans le cas de Rhagium, on constate un intima chitineux et une musculature bien développée, ce qui autorise à admettre que l'absorption même doit se faire dans l'intestin moyen.

Si nous trouvons une assez forte activité enzymatique dans l'intestin postérieur, cette activité peut être due aux matières qui traversent la cavité de l'intestin postérieur, car le suc digestif ainsi que le bois restent assez long-

temps dans l'intestin postérieur.

C'est donc dans la poche gastrique et l'intestin moyen que s'effectuent la digestion et la sécrétion du tube digestif, mais il peut y avoir régurgitation du suc gastrique vers l'oesophage au moment où la larve perfore sa galerie, phénomène qui a été observé chez d'autres insectes parmi lesquels nous citerons ici Capnodis miliaris KUG. (CHARARAS - COURTOIS) (14).

Pendant la nutrition, cette régurgitation du suc gastrique pourrait jouer un rôle surtout dans le cas de la pectine, car il peut agir sur les membranes des cellules du bois. Mais la principale activité digestive doit intervenir dans la poche gastrique et l'intestin moyen où le bois reste assez longtemps et où nous observons une activité secrétrice intense.

Quant au rôle des tubes de Malpighi, on sait depuis longtemps qu'ils exercent une fonction excrétrice, pour l'élimination des déchets du métabolisme ou des substances absorbées en excès. Chez certaines espèces, on a reconnu dans les tubes de Malpighi des cristaux d'urates de sodium, de calcium, d'ammonium et même d'acide urique.

Généralement, on ne considère pas les tubes de Malpighi comme exerçant une secrétion d'enzymes. Cependant, certains auteurs comme MARCUS (68) (1930) pensent que

les tubes de Malpighi secrètent des enzymes qui, chez les Authrènes, agiraient surtout sur la cellulose, mais comme certains auteurs l'indiquent, ces données déjà anciennes demandent à être revues.

Si le rôle joué dans la digestion par les tubes de Malpighi n'a pas été établi, leur rôle excréteur est par contre bien étudié, comme de nombreux auteurs l'ont déjà fait, notamment LISON (63), POLL (82), et CHARARAS (11) pour les Scolytidae xylophages. Il a été démontré que les tubes de Malpighi éliminent rapidement des colorants dits diffusibles comme le carmin d'indigo. Ce colorant traverse les cellules malpighiennes sous une forme diffuse et se concentre dans la lumière du tube d'où il est éliminé vers le rectum.

Chez Rhagium inquisitor L., la fonction excrétrice est nettement établie, puisque l'on trouve les colorants (carmin d'indigo) dans la partie rectale où se forme le cryptosolénisme.

B - LA SYMBIOSE

Bien que nous ayons montré que l'action digestive se localise dans la poche gastrique et l'intestin moyen, où existe la sécrétion du suc digestif, nous ne pouvons

cependant pas passer sous silence la présence de micro-organismes (levures et bactéries) qui doivent contribuer en partie à la digestion. Nous n'avons pas procédé à la culture de ces microorganismes pour démontrer leur action vis-à-vis de divers substrats, mais nous savons que chez d'autres Cerambycidae (Leptura rubra) les cryptes à levures sont bien développées ; tel est le cas également de Rhagium inquisitor L.

DESCHAMPS (41) a également observé dans l'intestin de Callidium sanguineum et de Rhagium inquisitor L. (Coléoptères Cerambycidae) des levures qui passent dans le tube digestif. Des cryptes analogues avec des levures ont été trouvées également chez les Anobiidae et c'est un cas très fréquent chez les Cerambycidae.

Si ces levures ne peuvent être considérées comme jouant le principal rôle dans la digestion, on peut cependant leur reconnaître une certaine action soit sur certains constituants soit dans l'élaboration des acides aminés ou des vitamines.

Chez un Coléoptère Curculionidae, Hylobius abietis L. THUILLIER, CHARARAS et COURTOIS ont isolé une levure (93) Candida brumptii dont le rôle cellulasique est minime et sans action bien nette, ce qui nous autorise à penser que ces levures jouent seulement un rôle complémentaire dans la digestion.

WIGGLESWORTH (100) précise que certains Coléoptères (notamment Dorcus), qui possèdent des levures ou autres microorganismes, ne peuvent cependant pas digérer la cellulose et le même auteur écrit "d'autres insectes qui se nourrissent de bois hébergent des organismes semblables aux levures, souvent à l'intérieur des cellules de l'insecte mais sont incapables de digérer la cellulose".

Sur frottis et coupes histologiques, CHARARAS (9) a pu observer de telles levures chez divers insectes xylophages notamment divers Curculionidae (Rhyncolus elongatus et Pissodes notatus ainsi que Penthartrum), mais ces insectes n'ont cependant pas pu être élevés sur cellulose pure, ce qui montre que malgré la présence des levures, il est difficile d'admettre la digestion de la cellulose.

Par contre, dans le cas des termites ainsi que chez certains Anobiidae, il peut y avoir une activité cellulasique comme GRASSE (52) l'a montré pour les termites.

Pour les Anobiidae comme Xestobium rufovilosum, les larves attaquent le bois sec et très vieux et les analyses de NORDMANN (74) montrent d'ailleurs une digestion très nette de la cellulose. D'après CHAUVIN, le rapport $\frac{\text{celluloses}}{\text{lignine}}$ varie en effet de 2,38 à 2,81 dans les vieilles

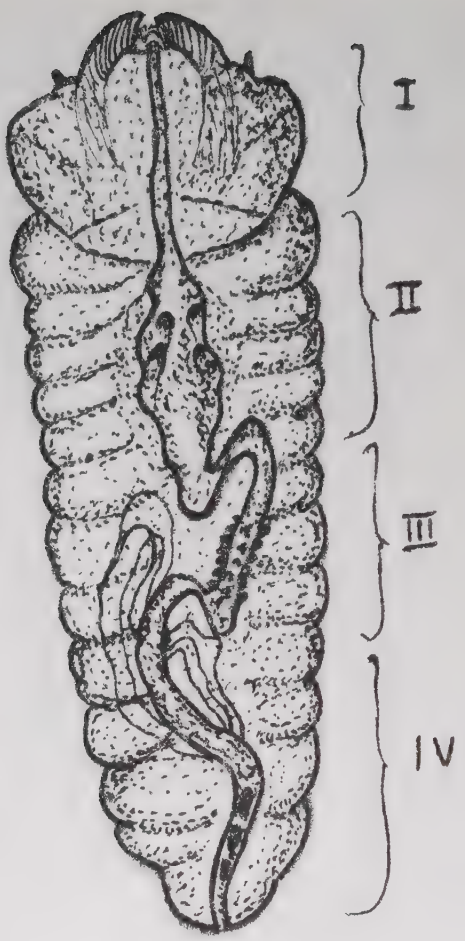
poutres de chêne alors que dans les excrétats il n'est plus que de 0,86 à 1,24.

Il est à noter que les larves de Xestobium rufovi-losum se développent mieux sur du vieux bois attaqué par des champignons comme Phellinus cryptarum et dans ce cas la prolifération de mycélium intervient favorablement dans la nutrition des larves en enrichissant le bois en azote. De plus les Anobiidae possèdent des symbiotes.

Il en est de même pour les insectes se nourrissant de bois complètement dégradé et pourri tel que divers Oryctes qui digèrent le bois grâce à l'intervention simultanée de diverses enzymes du tube digestif et de symbiotes existant dans le tube digestif.

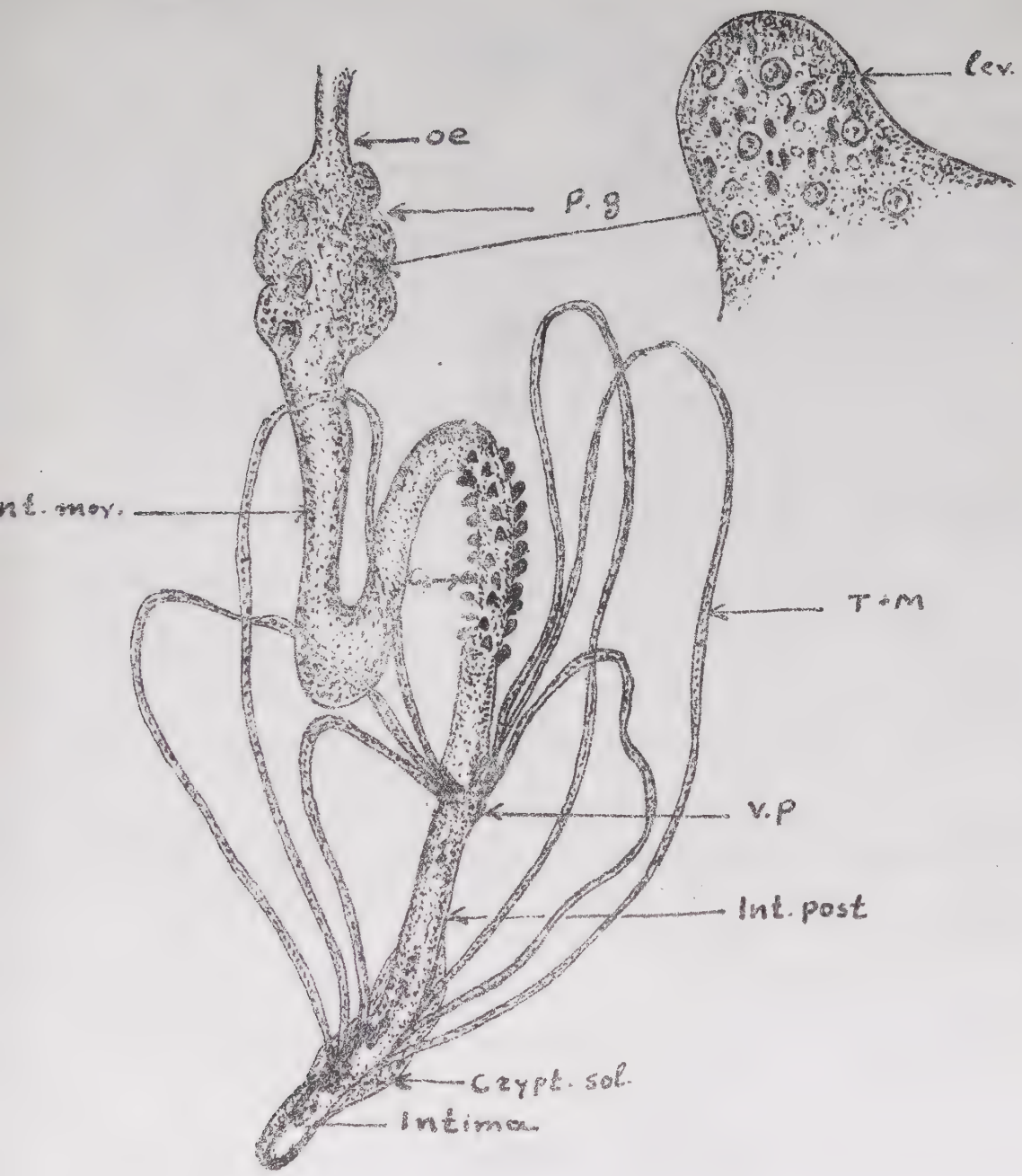
On rencontre également des symbiotes (diverses bactéries et champignons) dans l'intestin de la chenille de Cossus cossus, insecte doué d'une activité cellulasique comme l'indique d'ailleurs CHAUVIN (16) qui précise que l'attaque de la cellulose entraîne tout d'abord la libération de cellobiose puis du glucose, une partie étant oxydée en acide glucuronique.

Partie d'ecorce de *Pinus silvestris* attaquée par *Rhagium inquisitor*



Larve de *Rhagium* (face dorsale)
Représentation schématique de la position du tube digestif.

C Tube digestif.



Anatomie du tube digestif de Rhagium

LEGENDES

Schéma A : Partie d'écorce de Pinus silvestris attaquée par Rhagium inquisitor. Noter la présence de galeries de nutrition des larves (a, b, d) ainsi que le cocon formé (c) à la fin de la nutrition (stades nymphe et adulte). N = transformation en nymphe.

Schéma B : Larve de Rhagium (face dorsale) : représentation schématique de la position du tube digestif.
En I : tête ; II : poche gastrique et une petite partie de l'intestin moyen ; III : partie de l'intestin moyen et les cryptes ; IV : intestin postérieur.

Schéma C : Anatomie du tube digestif de la larve de Rhagium.
oe : oesophage ; pg : poche gastrique ; vp : valvule pylorique ; int. post. : intestin postérieur ; crypt. sol. : partie terminale du cryptosolénisme.

Noter la présence de boursouflures sous forme de caecums au niveau de la poche gastrique où nous avons décelé la présence de levures (lev.).

TROISIEME PARTIE

EQUIPEMENT ENZYMATIQUE DU TUBE DIGESTIF

-o-o-o-o-o-

LES ENZYMES DE RHAGIUM INQUISITOR L.

-o-o-o-o-o-

En ce qui concerne les enzymes de Rhagium inquisitor L., DESCHAMPS (1953) (41) a pu, par méthode directe (méthode colorimétrique), déceler une cellulase par des tests sur papier filtre traité par l'acide chlorhydrique concentré. En outre, il a réalisé d'autres recherches en utilisant non plus le papier filtre, mais la cellulose préparée à partir du coton ; en pratiquant un dosage du glucose au moyen de la méthode de Gabriel BERTRAND (5), il a pu déterminer ainsi une cellulase chez les larves de Rhagium inquisitor L.

Le même auteur a employé également des "méthodes microscopiques" sans toutefois préciser l'importance quantitative de l'activité cellulasique.

Pour les autres enzymes digestives, nous n'avons pas de données bibliographiques, ce qui nous a amenée à envisager l'étude de l'équipement enzymatique du tube digestif de Rhagium inquisitor L., et de le comparer brièvement avec celui d'autres insectes xylophages étudiés par COURTOIS, CHERRAS, Mesdames LAURANT et DEBRIS,

DEBRIS, ainsi que par THUILLIER. Nous pensons que ce travail pourra ouvrir des perspectives de rapprochement du processus de digestion chez divers insectes xylophages. Car, à l'encontre des espèces étudiées jusqu'alors, Rhagium inquisitor ne s'attaque qu'aux sujets physiologiquement déficients.

Etant donné que nous avons utilisé les mêmes techniques biochimiques et les mêmes substrats que ceux utilisés par les auteurs précités, nous pensons qu'il sera possible d'établir des comparaisons valables.

ETUDE DE LA REPARTITION DES DIFFERENTES OSIDASES ET POLYSACCHARIDASES CHEZ RHAGIUM INQUISITOR

-o-o-o-o-o-

Les insectes comme toutes les espèces du règne animal absorbent les glucides sous forme de monosaccharides. Ils doivent donc posséder des enzymes capables d'hydrolyser les oligosaccharides et polysaccharides, si nombreux dans la nature.

Les osidases possèdent une spécificité relativement étroite.

Dans cette partie de notre travail, nous exposerons les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité des différentes osidases et polysaccharidases du tube digestif des larves de Rhagium.

Dans ce but, nous avons séparé l'insecte en quatre parties : tête, poche gastrique et glandes salivaires, intestion moyen et intestin postérieur.

Pour chaque partie de l'insecte, nous avons étudié les enzymes directement extractibles (extrait A) et extractibles après gels et dégels successifs (extrait B).

Les enzymes hydrolysant les polysaccharides semblent être distincts de ceux qui attaquent les oligosaccharides, même lorsque les unités qui les constituent et le type de liaison sont identiques.

CHAPITRE I

ENZYMES AGISSANT SUR LES OLIGOSACCHARIDES ET HETEROSIDES

-o-o-o-

α GLUCOSIDASES E.C. (3-2-1-20)

Les oligosaccharides possédant des liaisons α glucosidiques (tréhalose, saccharose, maltose, turanose) sont d'après GILMOUR (51) régulièrement attaqués par les enzymes digestives des insectes.

La grande valeur nutritive de ces glucides vis-à-vis de mouches adultes (49), de larves et d'adultes : Abeilles (81) (96) a été signalée.

Les Insectes agissant d'une façon variable sur les différents α glucosides, ce qui fait penser à une spécificité des α-glucosidases et à l'existence de plusieurs types de ces enzymes chez les Insectes.

Ceci a d'ailleurs été mis en évidence par CHARARAS et M.M. DEBRIS (13) lors de l'étude de l'activité
- α-glucosidasique de différents insectes.

I - TREHALASE E.C. (3-2-1-28)

Le tréhalose est le principal glucide de l'hémolymphe de l'insecte. La tréhalase a été mise en évidence pour la première fois par FREREJACQUE en 1941 (50) chez différents insectes et depuis sa présence a été confirmée chez toutes les espèces où elle a été recherchée.

Les tréhalases sont rencontrées non seulement chez les insectes (KALF et RIEDER (57), mais aussi dans l'intestin du porc (DAHLQVIST (32) et le sérum humain (DEMELIER (40). Il a été montré en particulier avec la tréhalase purifiée de l'intestin de porc et de Galleria melonella que cette enzyme était spécifique et distincte des autres α-glucosidases.

Après purification, ces tréhalases sont sans action sur d'autres α-glucosides et en particulier le maltose.

Nous avons trouvé une activité tréhalasique importante dans les différentes parties de l'insecte et ce, surtout dans les extraits (A). Le pourcentage d'hydrolyse est voisin de 100 % pour l'enszyme directement extractible à partir de la tête et de l'intestin postérieur de la larve.

Le tableau N° (I) représente les activités tréhalasiques des extraits A et B des quatre parties du corps de la larve.

Le pH optimum de la tréhalase de Rhagium inquisitor se situe vers 5,4 ce qui est très proche des pH optimums que COURTOIS (23) a trouvés pour les tréhalases des différents insectes étudiés.

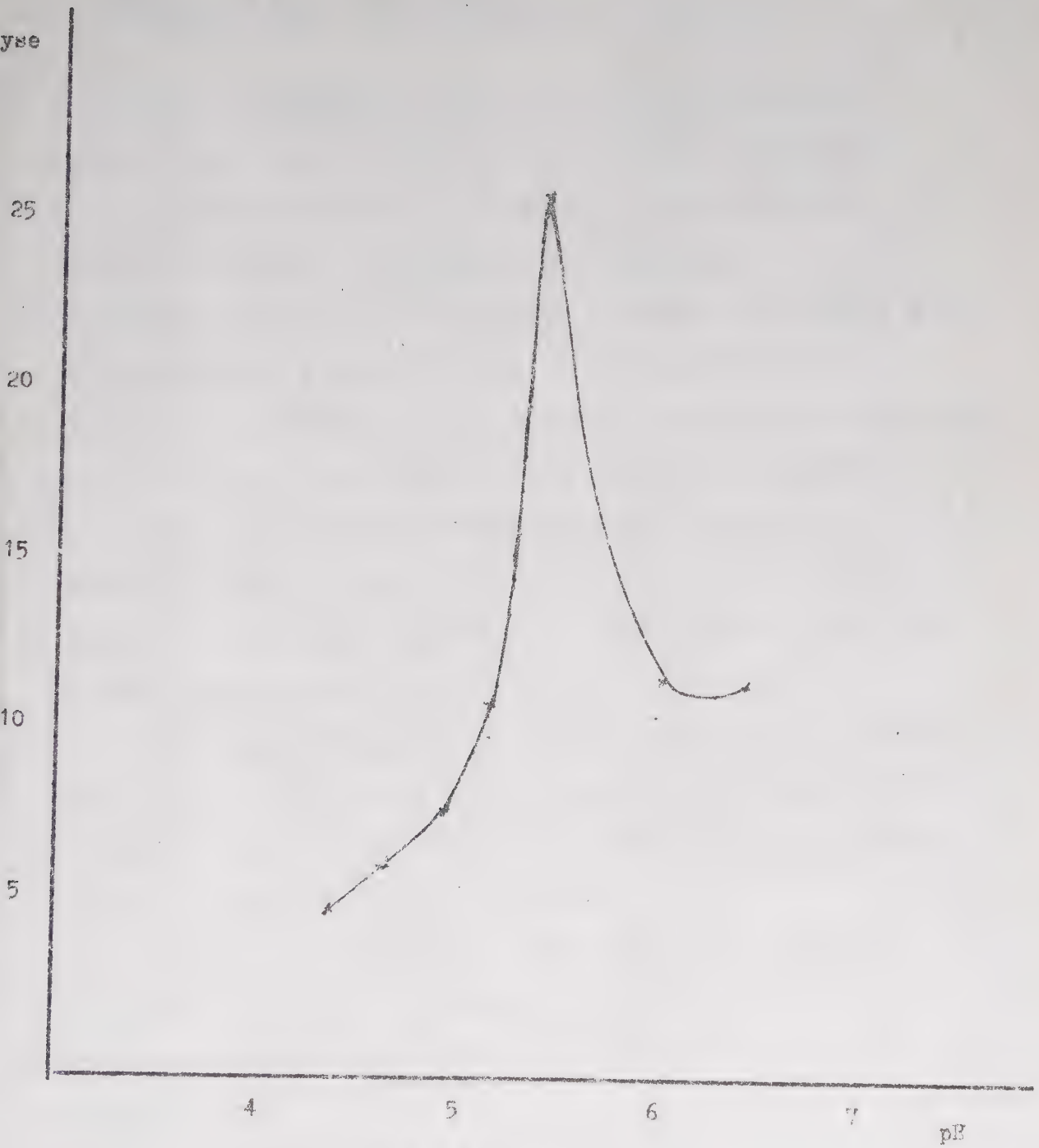
Les auteurs ayant étudié l'activité de la tréhalase lors de l'évolution de divers insectes xylophages (CHARARAS, COURTOIS, DEBRIS, LAURANT-HUBE (13), DEBRIS (36), THUILLIER (94), LE FAY (60) signalent une activité importante de cette enzyme à tous les stades évolutifs. Cette enzyme ne serait pas digestive mais interviendrait dans le métabolisme des glucides de l'insecte dont le tréhalose est, avec le glycogène, le principal représentant.

T A B L E A U N° I

ACTION SUR LE TREHALOSE

Essais à pH 5,4 et à 37° pendant 24 heures. Les chiffres du tableau correspondent au pourcentage d'hydrolyse du substrat. La concentration du substrat dans le milieu est M/50.

	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait (A)	Extrait (B)
Tête	9,5	100	1
Poche gastrique	37	44,4	28,7
Intestin moyen	28	83,3	16,4
Intestin postérieur	24	100	26,1



F I G U R E n° 2

HYDROLYSE DU TREHALOSE EN FONCTION DU pH

Substrat M/50 dans le milieu ; 0,5 ml de préparation enzymatique (larves entières A) réagissant 24 heures à + 37°.

II - INVERTASE E.C. (3-2-1-26)

Comme la tréhalase, l'invertase aussi est très répandue chez les insectes et son action hydrolysante sur le saccharose est le plus souvent très marquée. Cependant, Picta et Sciapteron tabaniformis ont une activité invertasique très faible (COURTOIS et DEBRIS (25).

GILMOUR (51) a montré que l'invertase du tube digestif des animaux est le plus souvent une α-glucosidase tandis que celle de la levure est une β-fructosidase. Ceci a été confirmé par THUILLIER (92). Par contre, COURTOIS, PETEK et KOLAHI-ZANOUSI (31) ont montré que l'hydrolyse du saccharose chez le Hanneton est due à une β-fructosidase qui agit à pH 6.

Chez Rhagium inquisitor, l'activité de l'invertase est élevée. Après une heure d'incubation, le pourcentage d'hydrolyse est considérable par rapport à ceux obtenus lors de l'étude des autres enzymes.

L'activité invertasique est répartie à peu près uniformément le long de tout le corps de la larve et elle se retrouve essentiellement dans les extraits (A), (tableau N° II).

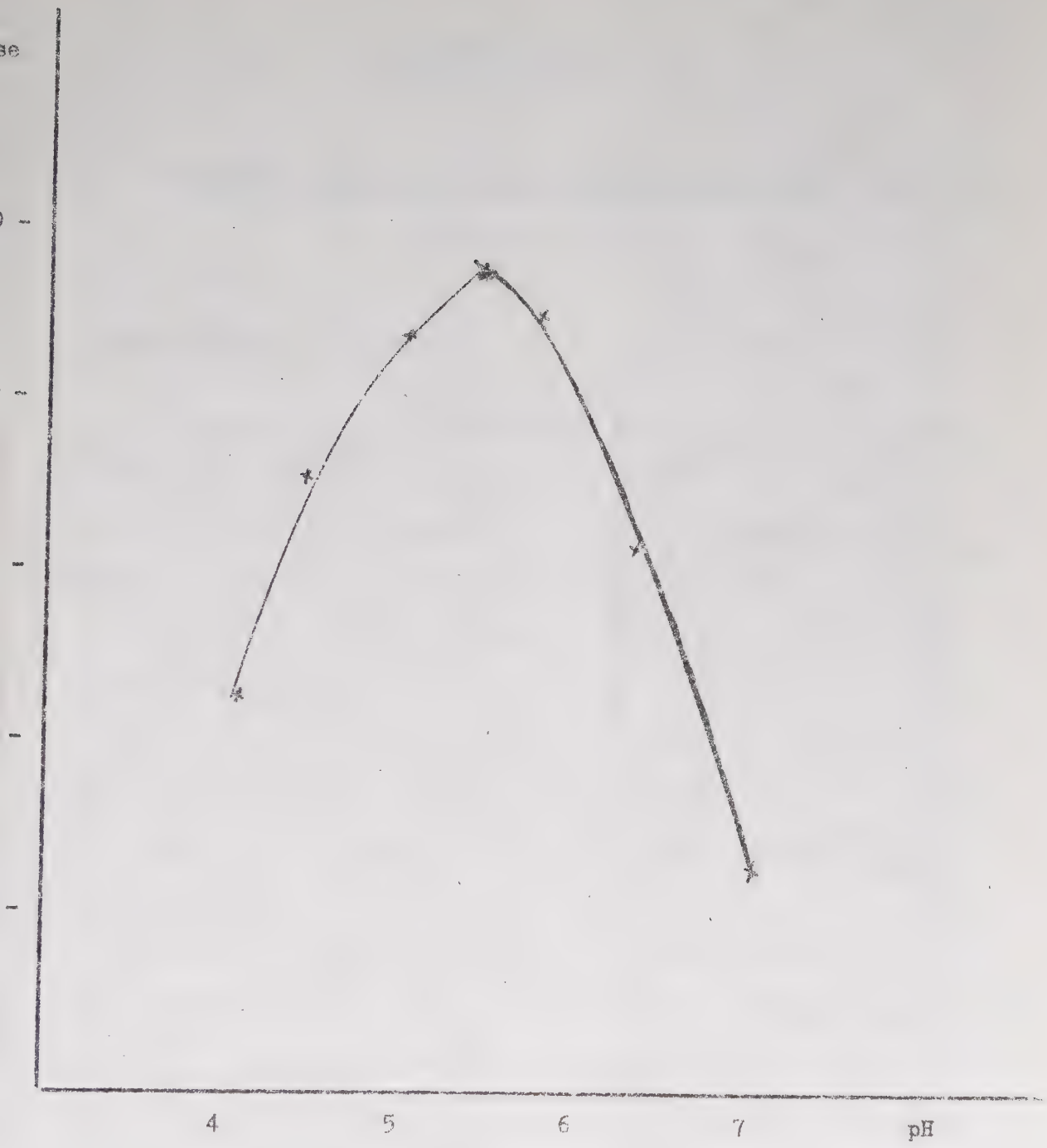
Le pH optimum se situe vers 5,2 (fig. n° 3).

T A B L E A U N° II

ACTION SUR LE SACCHAROSE

Essais à pH 5,2 et à + 37° pendant 24 heures. Les chiffres du tableau correspondent au pourcentage d'hydrolyse du substrat. La concentration du substrat dans le milieu est M/50.

	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait enzymatique (A)	Extrait enzymatique (B)
Tête	9,5	70,8	1,9
Poche gastrique	37	34,7	0
Intestin moyen	28	84,72	8,1
Intestin postérieur	24	80	3,2



F I G U R E n° 3

HYDROLYSE DU SACCHAROSE EN FONCTION DU pH

Substrat M/50 dans le milieu ; 0,5 ml de préparation enzymatique (larves entières A) réagissant 24 heures à + 37°.

CHAPITRE II

ENZYMES AGISSANT SUR LES POLYSACCHARIDES

-o-o-o-o-o-o-

I - AMYLASE E.C. (3-2-1-1)

Les amylases sont des enzymes très fréquentes chez les insectes. C'est à elles qu'ils doivent la capacité d'utiliser l'amidon, principale réserve glucidique des végétaux localisée au niveau des amyloplastes.

L'amidon se compose de deux constituants : l'amylose et l'amylopectine.

L'amidon de blé et de pomme de terre renferme 20 à 25 % d'amylose et 72 à 80 % d'amylopectine.

L'amylose est formé de chaînes de 250 à 300 unités d' α-glucopyranose liées en (1 ⟶ 4).

L'amylopectine est une molécule branchée renfermant environ 1000 unités d' α-glucopyranose : des chaînes de 2^0 à 25 unités de glucose liées par des liaisons α (1 ⟶ 4), se fixant par le groupe réducteur du glucose terminal à la fonction alcool primaire d'une unité glucose d'une autre chaîne ; on retrouve ainsi dans l'amidon 96 % de liaisons α (1 ⟶ 4) et 4 % de liaisons α(1 ⟶ 6).

L'amidon, comme le glycogène, forme dans l'eau des suspensions colloïdales qui seront facilement attaquées par différents types d'enzymes rompant soit les liaisons 1 ⟶ 4 (amylases), soit les liaisons 1 ⟶ 6 (amyloglucosidases).

Deux types distincts d'amylases sont retrouvés chez les animaux et les plantes :

- L'endo-amylase ou α -amylase qui attaque les chaînes d'amylose à l'intérieur de celles-ci ;
- et l'exoamylase ou β -amylase qui détache les unités de maltose à partir des extrémités non réductrices.

Le maltose présent sous forme α dans le polysaccharide est libéré sous forme β après inversion de Walden.

WIGGLESWORTH (98) a montré que l'amylase des glandes salivaires de Blatte est identique à celle de la salive humaine, il s'agit d'une endo-amylase.

Il existe encore un groupe d'amylases fréquent chez les micro-organismes telle l'amyloglucosidase d'Aspergillus niger. Elle hydrolyse la liaison terminale de l'extrémité non réductrice et donne naissance progressivement à du glucose.

La répartition des amylases chez divers insectes a été étudiée et tous les résultats ne concordent pas.

BRAMSTEDT (7) trouve l'amylase dans les glandes sali-

vaires et la poche gastrique chez certains Aphides, alors que DUSPIVA (44) ne la trouve pas dans les glandes salivaires d'autres espèces d'Aphides.

Par ailleurs, ces deux chercheurs étudiant l'amylase de la salive d'un Aphide, Eriosoma lanigerum, ont donné des résultats contradictoires.

AUCLAIR (4) pense que chez les Aphides, l'amylase provient soit de bactéries, soit de levures qui se trouvent dans l'intestin de l'insecte.

COURTOIS et DEBRIS (28) ont trouvé une forte activité amylasique chez différents insectes xylophages, phytophages ainsi que chez l'abeille. Le produit final d'hydrolyse est le glucose. Ce résultat a été retrouvé par LE FAY (59) chez Ips sexdentatus.

DEBRIS (36) n'a pas identifié l'amylase des espèces étudiées et suppose qu'il s'agit soit de l'action d'une α ou β (-amylase suivie de celle d'une maltase associée, soit d'une seule amyloglucosidase du type de celle, purifiée par PAZUR et coll. (78) (79) à partir d'Aspergillus niger.

DAY et WATERHOUSE (35) ont trouvé pour les amylases des divers insectes des pH optim allant de 5,5 à 9,5.

Lors de notre étude de la répartition de l'activité amylasique chez Rhagium, nous avons retrouvé une forte activité au niveau de la poche gastrique et plus précisément dans l'extrait (B). Les autres parties de l'insecte présentent une activité faible (tableau N° III).

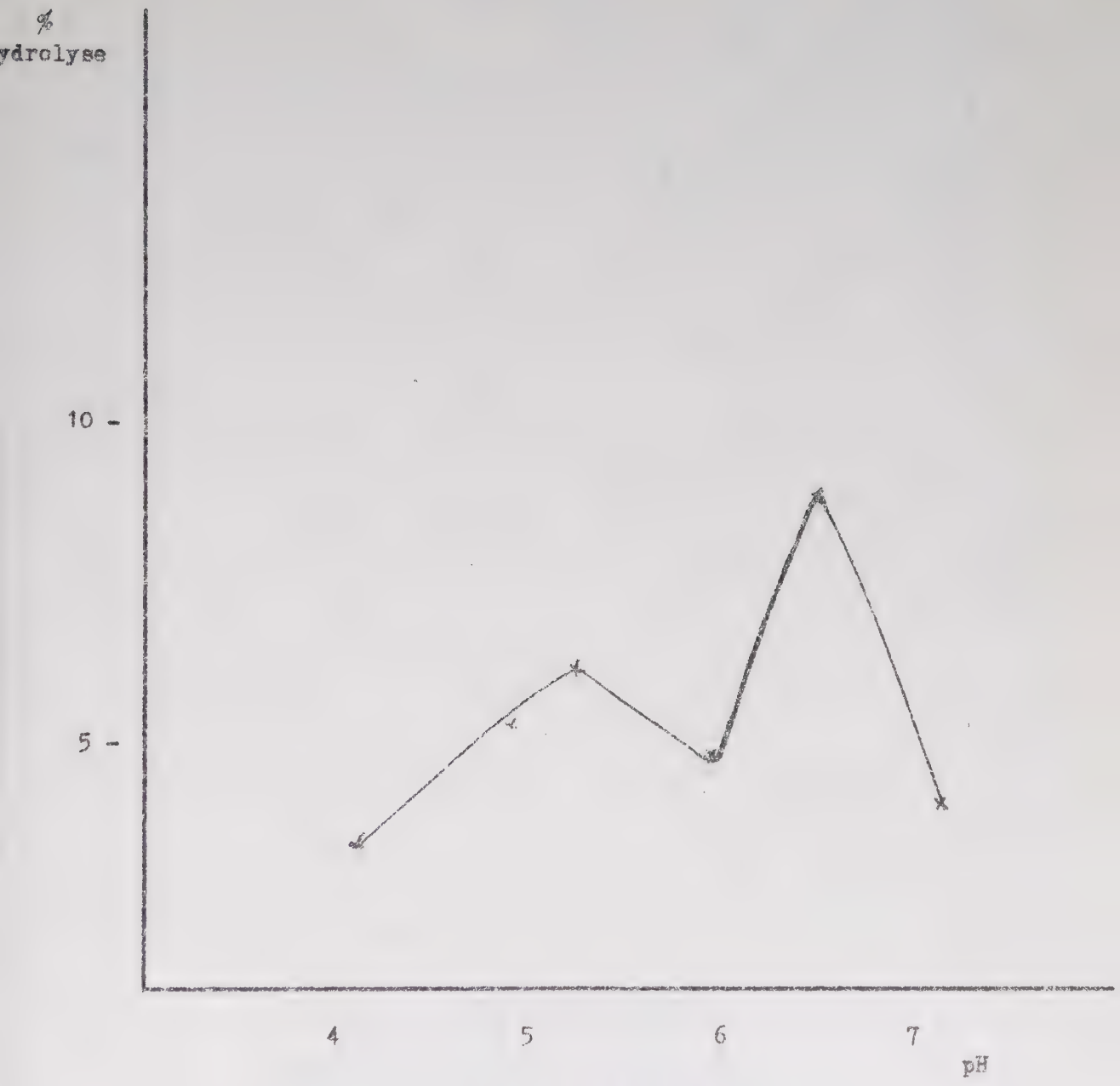
Lors de l'étude du pH optimum d'un extrait de larves entières, nous avons pu observer deux optimums d'activité, l'un à pH 5,2 - 5,4 et l'autre à pH 6 - 6,2. Ces deux pH ont été retrouvés lors de l'étude de l'extrait de la poche gastrique (B), (fig. n° 5). Ces résultats seraient en la faveur de la présence de deux types d'amylases chez Rhagium.

T A B L E A U N° III

ACTION SUR L'AMIDON

Essais à pH 5,2 et à + 37° pendant 24 heures. Les chiffres du tableau expriment le pourcentage des liaisons osidiques rompues. La concentration du substrat dans le milieu est : M/50 en anhydroglucose.

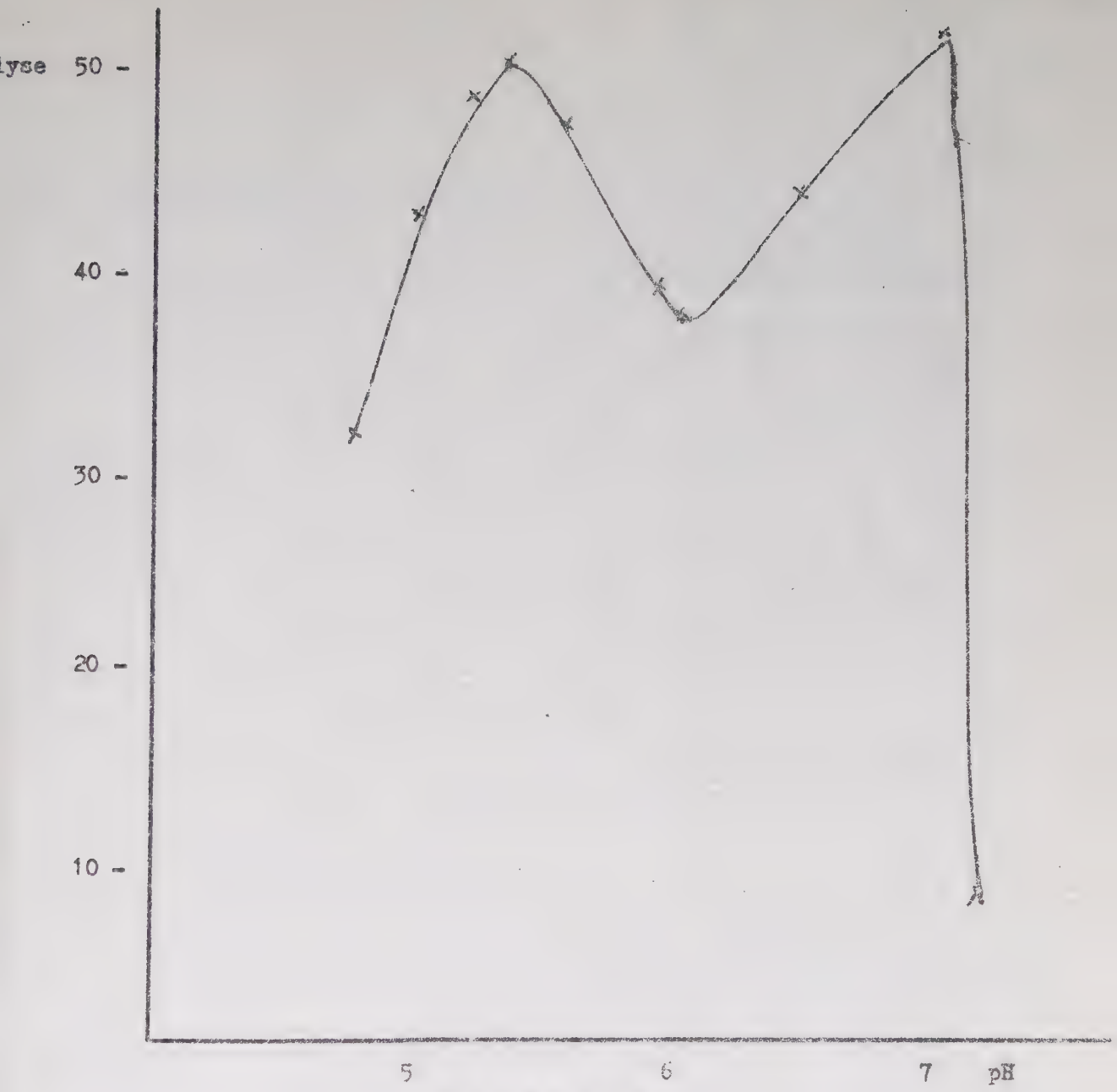
	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait (A)	Extrait (B)
Tête	9,5	11,1	1,3
Poche gastrique et glandes salivaires	37	4,4	70,4
Intestin moyen	28	4,4	1,3
Intestin postérieur	24	26,8	1,3



F I G U R E n° 4

HYDROLYSE DE L'AMIDON EN FONCTION DU pH

Substrat M/50 en anhydroglucose dans le milieu. 0,5 ml de préparatio
enzymatique (larves entières A) réagissant 24 heures à + 37°.



F I G U R E n° 5

HYDROLYSE DE L'AMIDON EN FONCTION DU pH

Substrat M/50 en anhydroglucose dans le milieu. 0,5 ml de préparation enzymatique (poche gastrique B) réagissant 24 heures à + 37°.

II - CELLULASES E.C. (3-2-1-4)

La cellulose est constituée de chaînes non ramifiées de β-glucopyranose liées en (1 ⟶ 4), l'unité de base du polysaccharide étant le cellobiose. Ces chaînes sont réunies entre elles par des liaisons hydrogène très fortes, auxquelles viennent s'ajouter des forces de VAN der WAALS. Il en résulte pour la cellulose, une structure compacte qui en fait un substrat difficilement attaqué par les enzymes, contrairement à l'amidon dans lequel les chaînes d'α-glucose sont ramifiées.

L'activité des cellulases varie en fonction de la structure du substrat. Plus la cellulose présente un degré de cristallisation élevé, plus son attaque par les enzymes est difficile (papier, coton, etc....).

Par contre, la "cellulose gonflée" et les celluloses substituées seront plus facilement attaquées. Cela tend à montrer que l'enzyme, pour hydrolyser les liaisons β-glucosidiques (1 ⟶ 4) doit s'insérer dans les molécules de son substrat, afin d'atteindre ces liaisons.

SELBY et Coll. (90) ont trouvé une cellulase active sur les fibres de coton, différente de celle agissant sur les substrats cellulosiques gonflés ou solubles.

C'est pourquoi ANDERSON, CUNNINGHAM et MANNERS (3)

ont proposé d'appeler cellulases, les seules enzymes hydrolysant les celluloses insolubles naturelles ; les β (1 ⟶ 4) glucosanases hydrolysant les celluloses solubles (CMC, HEC).

Le mode d'action des cellulases est encore discuté. Pour WHITAKER (97) chez Myrothecium verrucaria, l'activité cellulasique serait due à une seule enzyme alors que pour REESE (84) et SELBY (90), plusieurs enzymes différentes interviendraient. Une enzyme C_1 transformerait la cellulose cristalline en chaînes linéaires. Celles-ci seraient dépolymérisées par une enzyme Cx qui serait une β (1 ⟶ 4) glucosanase pouvant attaquer les chaînes soit aux extrémités, soit à l'intérieur (random).

La plupart des cellulases isolées appartiennent à des microorganismes tels que Cytophaga (15), Myrothecium verrucaria (97). L'enzyme de cette espèce a d'ailleurs fait l'objet d'une étude approfondie. Par contre, la cellulase est très peu répandue dans le règne animal et son existence a fait l'objet de nombreuses discussions afin de préciser si l'enzyme appartenait en propre à l'animal ou était secrété par des microorganismes présents dans le tube digestif.

Afin de déterminer l'action des différentes parties de Rhagium inquisitor sur la cellulose, nous avons utilisé trois substrats :

- la cellulose gonflée
- la CMC
- l'HEC

1) Cellulose gonflée

Parmi les nombreux insectes xylophages étudiés par COURTOIS et DEBRIS (26), seules deux espèces ont manifesté une activité vis-à-vis de ce substrat (Pissodes notatus et Capnodis miliaris). Par ailleurs, aucune activité n'a été mise en évidence par THUILLIER (92) chez un Curculionidé, Hylobius abietis, ni chez la levure intracellulaire de cet insecte (94).

Pour notre part, nous n'avons observé chez Rhagium inquisitor aucune activité vis-à-vis de ce substrat.

2) Carboxyméthylcellulose

Chez Rhagium inquisitor, nous avons pu montrer que l'hydrolyse provoquée par la β (1 $\longrightarrow$ 4) glucosanase est assez importante comme le montre le tableau N° IV.

Le taux de l'hydrolyse est sensiblement le même dans les différentes parties du corps de la larve.

L'activité présente un seul optimum à pH 4,8 (fig. n° 6).

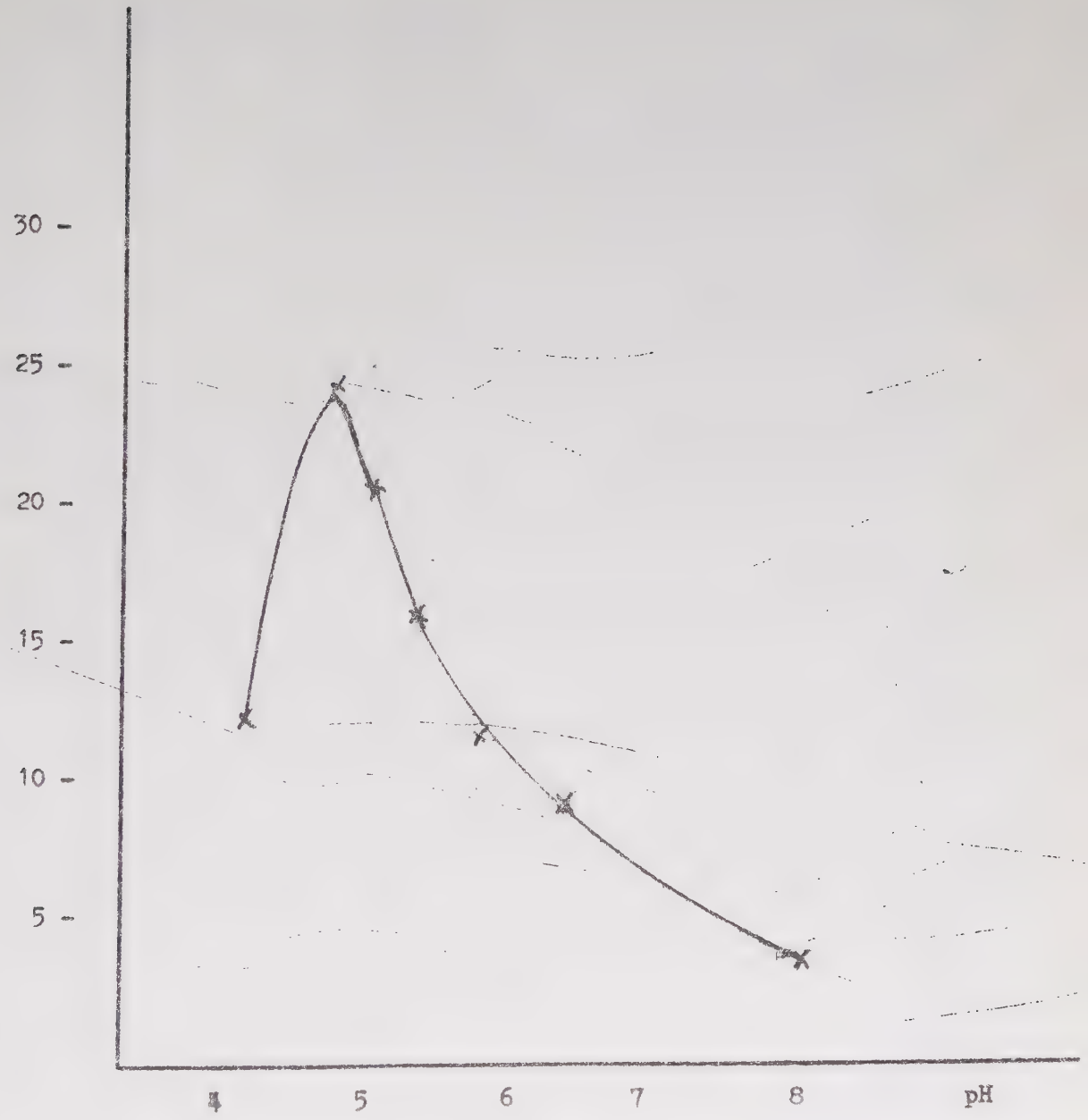
Un effet comparable a été observé avec de nombreuses préparations enzymatiques de divers insectes xylophages (COURTOIS et coll. (24), TUILLIER, (95), LE FAY (60),

T A B L E A U N° IV

ACTION SUR LA CARBOXYMETHYLCELLULOSE

Essais à pH 4,8 et à + 37° pendant cinq jours. Les chiffres du tableau expriment le pourcentage des liaisons osidiques rompues. La concentration du substrat dans le milieu est : de 4 mg/1,25 ml.

	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait enzymatique (A)	Extrait enzymatique (B)
Tête	9,5	28,6	12,4
Poche gastrique	37	16,7	13,2
Intestin moyen	28	17,3	15,3
Intestin postérieur	24	24,2	16,1



F I G U R E n° 6

HYDROLYSE DE LA CARBOXYMETHYLCELLULOSE

EN FONCTION DU pH

Substrat 4 mg/1,25 ml dans le milieu. 0,5 ml de préparation enzymatique (larves entières A) réagissant 5 jours à + 37°.

3) Hydroxy-éthyl-cellulose

L'activité des extraits enzymatiques sur l'HEC est très faible et la détermination des groupements réducteurs opérant sur la technique de Nelson-Somogyi s'est avérée difficile. C'est pourquoi nous avons utilisé la méthode [illegible] préconisée par COURTOIS et BUL KHAO [illegible] (2[illegible]) qui permet d'obtenir indirectement l'activité des extraits des différentes parties de l'insecte sur l'HEC.

A 8 ml de solution aqueuse d'HEC à 2 %, préparée 24 heures avant l'emploi par gonflement à la température du laboratoire et conservée à la glacière, nous ajoutons

- [illegible] ml du tampon (phosphate disodique 0,2 M - acide [illegible] 0,1 [illegible] pH 5,[illegible]

- [illegible] de la préparation cellulasique.

Après une incubation à + 37° pendant 30 minutes, [illegible] procédons à la mesure de la viscosité à la même tempéra[illegible]

Nous effectuons en outre une détermination de visc[illegible] [illegible] les mêmes réactifs, mais où l'enzyme est remplacée par 1 ml d'eau.

Nous exprimons les résultats en diminution de la viscosité [illegible] cellulosique.

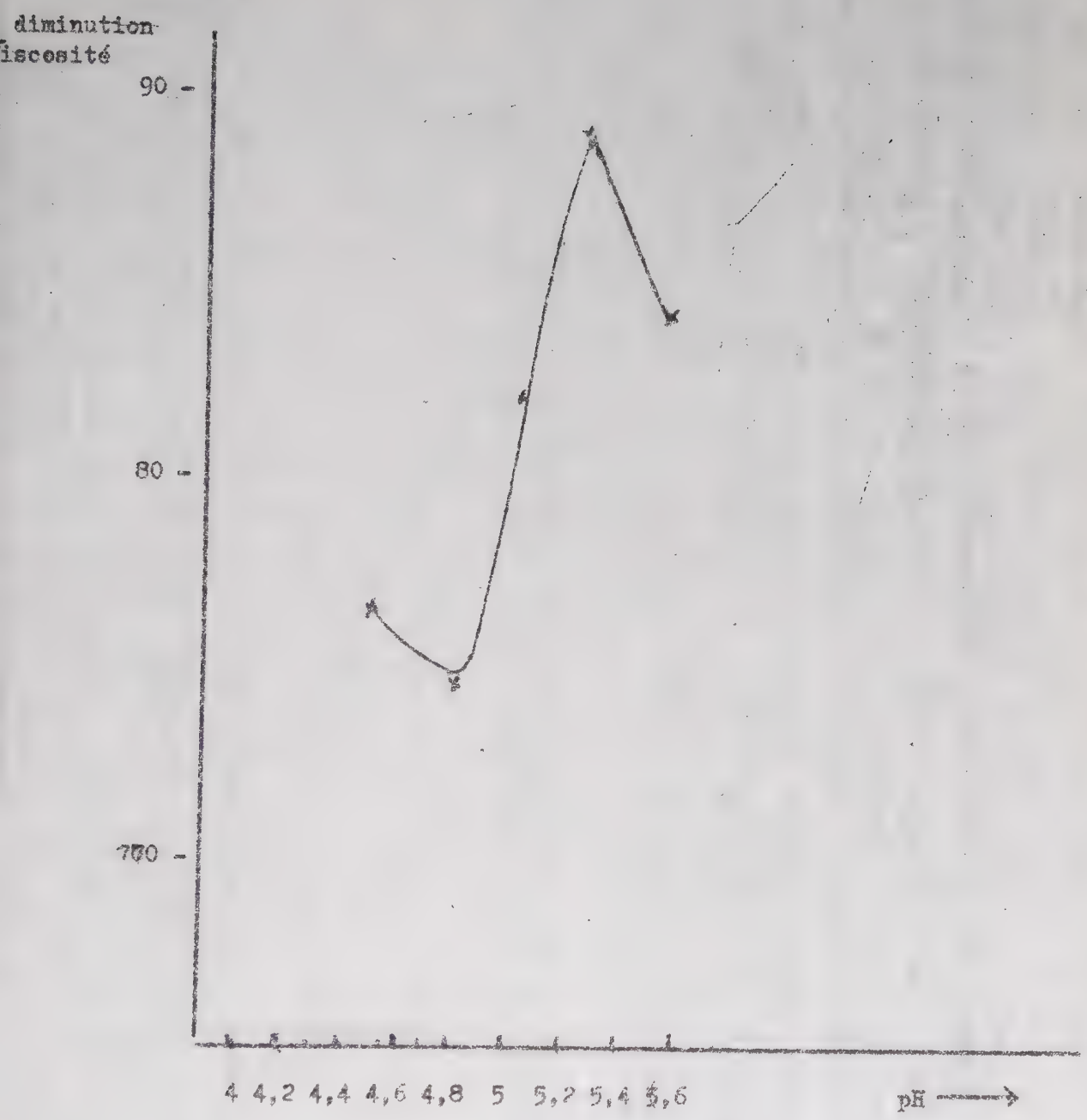
T A B L E A U N° V

ACTION SUR L'HEC

Essais à pH 5,2 et à + 37° pendant 30 minutes. Les chiffres du tableau expriment les unités cellulasiques par gramme de tissu d'insecte.

La concentration du substrat dans le milieu est de 160 mg.

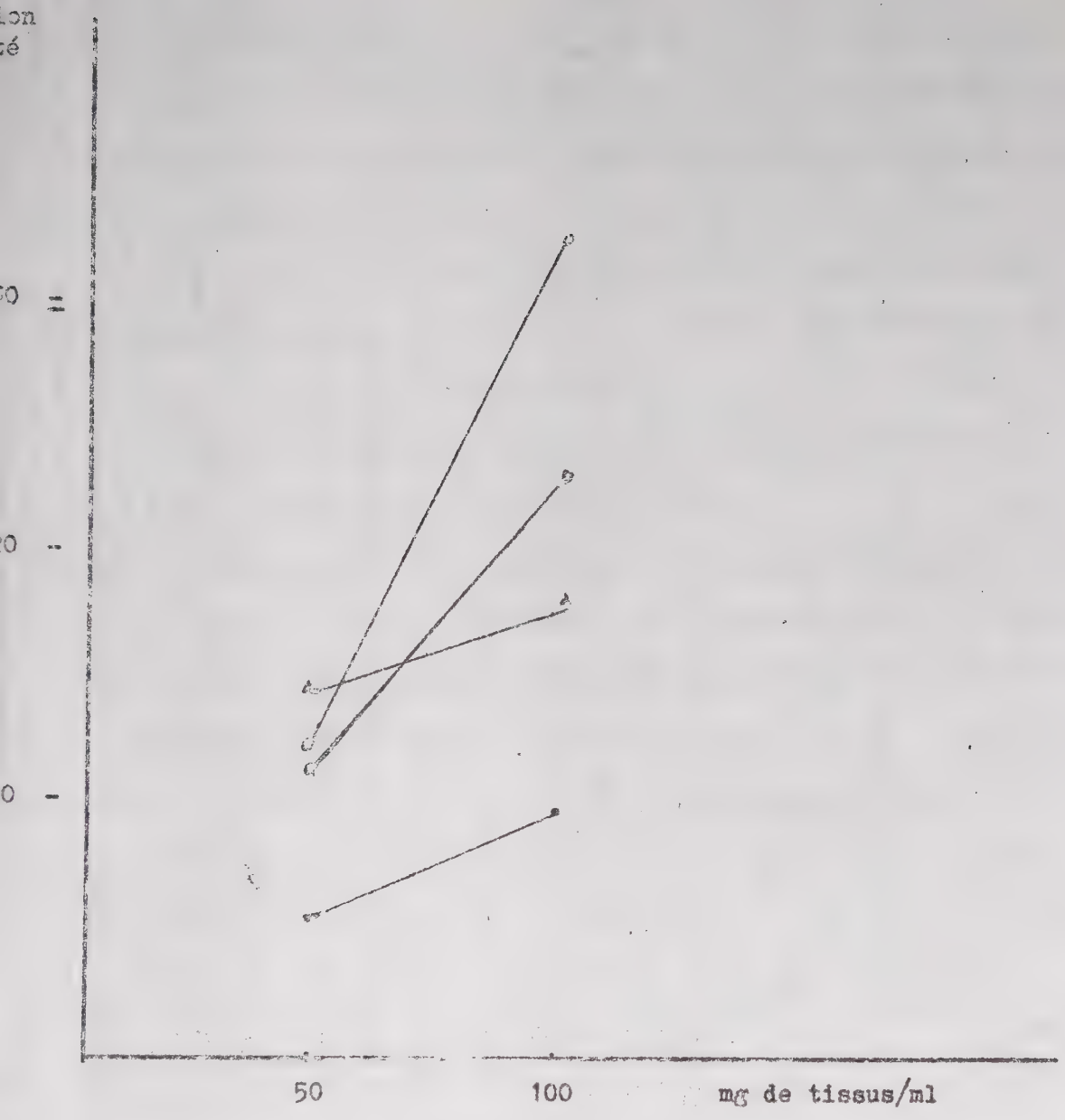
	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait enzymatique (A)	Extrait enzymatique (B)
Tête	9,5	3 000	0
Poche gastrique	37	7 800	0
Intestin moyen	28	8 850	4 000
Intestin postérieur	24	7 850	0



F I G U R E n° 7

HIDROLYSE DE L'HEC EN FONCTION DU pH

Substrat dans le milieu 160 mg. 1 ml de préparation enzymatique correspondant à 60 mg d'insecte (poche gastrique A) réagissant 30 min à +37°.



F I G U R E n° 8

DIMINUTION DE LA VISCOSITE APRES HYDROLYSE ENZYMATIQUE

DE L'HEC PAR DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TISSUS DE LARVES

Courbe	extrait (A)	de la tête
"	"	de la poche gastrique
"	"	de l'intestin moyen
"	"	de l'intestin postérieur

Comme le montre le tableau N° V, les différentes parties de la larve possédent une activité vis-à-vis de l'HEC, activité localisée dans les extraits (A) avec une prédominance au niveau de l'intestin et de la poche gastrique.

Les activités des différentes préparations enzymatiques vis-à-vis de l'HEC et la CMC ne semblent pas totalement superposables (répartition différente et pH optimum différent). Peut-être serait-on en présence de deux enzymes différentes.

Par contre, l'activité sur la cellulose gonflée est divergente, ce qui confirmerait la notion de l'existence d'enzymes différentes attaquant la cellulose : cellulase et β (1 ⟶ 4) glucosanases.

III - HEMICELLULASES

Les Hémicellulases sont fréquentes chez les Insectes xylophages, comme CHARARAS et DEBRIS (12) ont pu le montrer.

Les hémicelluloses sont parmi les plus importants constituants du bois. Elles comprennent l'ensemble des polysaccharides, autres que la cellulose et les substances pectiques, présents dans les parois cellulaires. Les différents composants des hémicelluloses sont liés entre eux par des liaisons hydrogènes, ce qui leur confère leur insolubilité dans l'eau, mais une fois isolées leurs propriétés sont modifiées et en particulier leur solubilité.

Etant donnée la complexité des hémicelluloses, de nombreuses enzymes seront nécessaires pour scinder les différents types de liaisons osidiques qui s'y trouvent.

COURTOIS et DEBRIS (29) ont étudié l'activité hémicellulasique de plusieurs espèces d'insectes xylophages sur différents substrats : (hémicellulose cl, B_7, xylane DA et xylane 4 bis). Tous les substrats sont attaqués par les insectes xylophages, mais pas par les insectes phytophages ni l'abeille.

Ips, Antaxis et Capnodis sont les plus actifs.

L'incubation est prolongée pendant cinq jours à + 37° et dans un milieu de pH 5,2. Seuls les extraits (B) sont actifs et en particulier ceux de la poche gastrique. Leur activité hémicellulasique se traduit par une libération de glucose et mannose à partir de l'hémicellulose B_7, ce qui est en la faveur d'une enzyme attaquant la partie glucomannane. Aucune libération de dérivé uronique n'a pu être observée.

T A B L E A U N° VI

ACTION SUR L'HEMICELLULOSE B7

Essais à pH 5,2 et à + 37° pendant cinq jours. Les chiffres du tableau expriment le pourcentage des liaisons osidiques rompues. La concentration du substrat dans le milieu est : 4 mg/1,25 ml.

	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait enzymatique (A)	Extrait enzymatique (B)
Tête	9,5	0	34,6
Poche gastrique	37	2	61,5
Intestin moyen	28	5,32	42,5
Intestin postérieur	24	4,1	50,1

IV - GLUCOMANNANE

Nous avons préparé la glucomannane à partir du salep, selon le protocole de DALOUL.

Après une incubation de cinq jours à + 37° et à pH 5,2, les différents extraits (A) et (B) ont donné les résultats résumés dans le tableau N° VII.

T A B L E A U N° VII

ACTION SUR LA GLUCOMANNANE

Essais à pH 5,2 et à + 37° pendant cinq jours. Les chiffres du tableau expriment le pourcentage des liaisons osidiques rompues. La concentration du substrat dans le milieu est : 1 mg/1,25 ml.

	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait enzymatique (A)	Extrait enzymatique (B)
T Tête	9,5	4,7	30,1
Poche gastrique	37	0	46,8
Intestin moyen	28	4,5	34,6
Intestin postérieur	24	3	39,1

L'activité se traduit par une libération de glucose et de mannose et tout comme pour l'activité hémicellulasique B_7 se retrouve essentiellement dans les extraits (B) avec une intensité maximum au niveau de la poche gastrique.

Tous ces résultats seraient en la faveur de l'identité des deux actions enzymatiques.

V - LAMINARINASE

La laminarine est une β (1 ⟶ 3) glucane similaire à la callose, polysaccharide insoluble qui oblitère les tubes criblés en les mettant hors service.

Les extraits enzymatiques de Rhagium inquisitor, et en particulier ceux de la tête, manifestent une activité hydrolysante très accentuée vis-à-vis de la laminarine (Tableau N° VIII).

Il est permis de se demander si la salive de la larve ne facilite pas le percement des galeries au niveau des tubes criblés oblitérés. En outre, les enzymes dépolymérisant les β (1 ⟶ 3) glucanes peuvent présenter un intérêt nutritionnel en fournissant du glucose.

T A B L E A U N° VIII

ACTION SUR LA LAMINARINE

Essais à pH 5,2 et à 37° pendant cinq jours. Les chiffres du tableau expriment le pourcentage de liaisons osidiques rompues. La concentration du substrat dans le milieu est : 1 mg/1,25 ml.

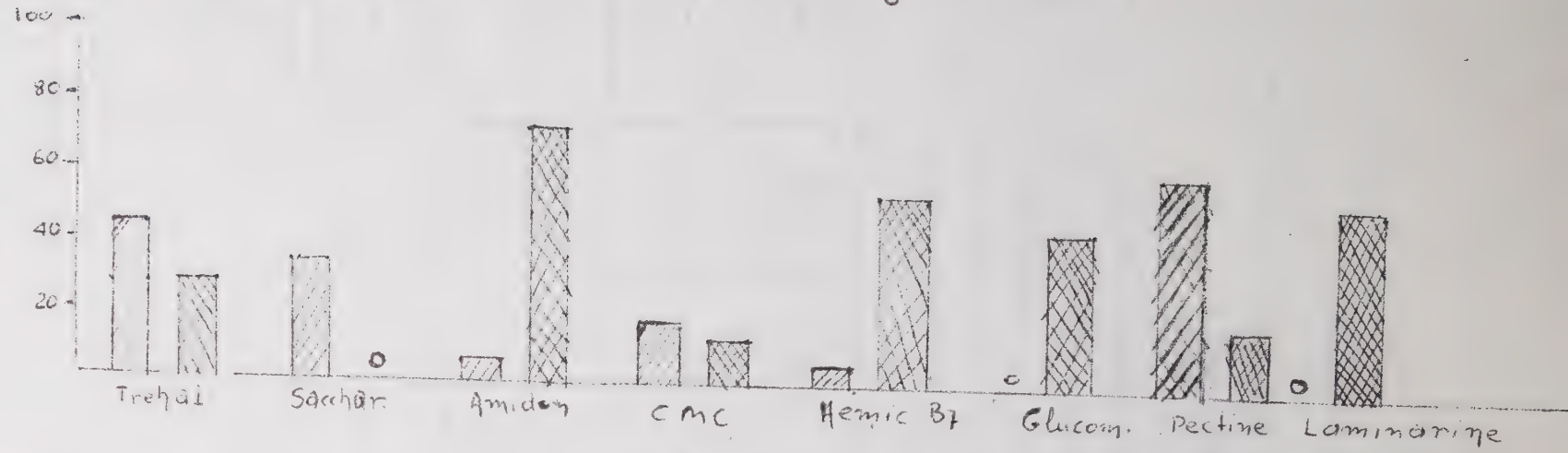
	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait enzymatique (A)	Extrait enzymatique (B)
Tête	9,5	90	40,6
Poche gastrique	37	0	35,2
Intestin moyen	28	0,9	46
Intestin postérieur	24	33	25,7

VI - PECTINASE

Rhagium inquisitor est capable d'hydrolyser les substances pectiques. L'étude détaillée de cette activité enzymatique fera l'objet de la quatrième partie de ce travail.

Extrait B

Poche gastrique



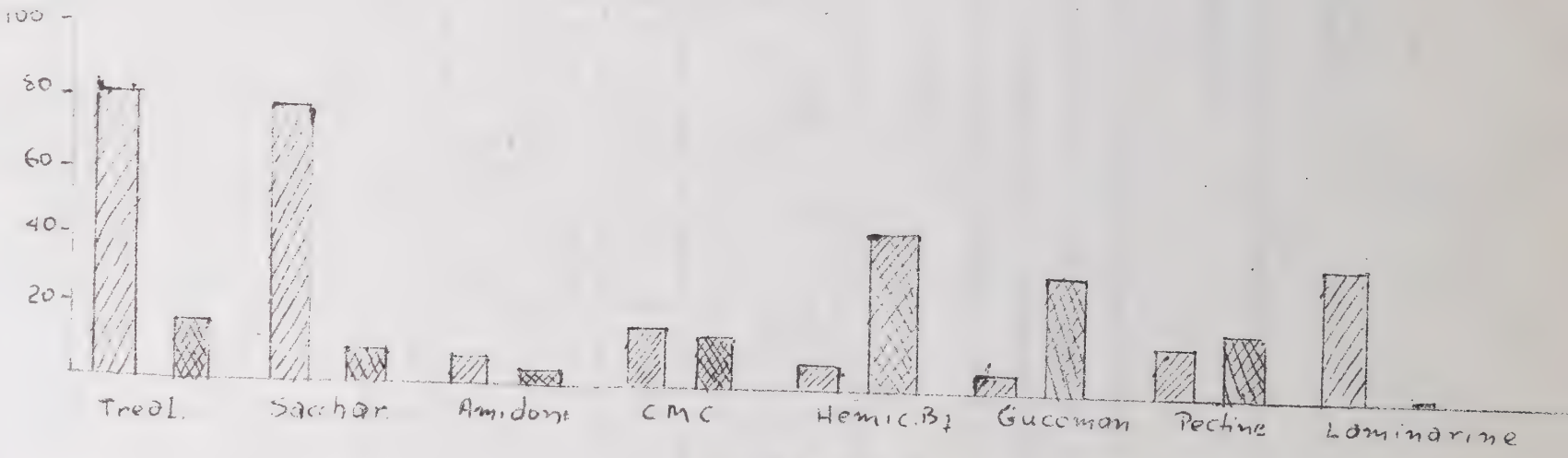


FIGURE n° 9

Activité enzymatique des Extraits de poche gastrique et d'intestin moyen vis à vis des différents substrats étudiés

T A B L E A U N° IX

ivité hydrolytique des différentes parties du tube digestif de la larve de Rhagium inquisitor

Les chiffres expriment le pourcentage de liaisons osidiques rompues après incu-ion à + 37° pendant 24 heures (amidon, saccharose et tréhalose) et pendant cinq rs pour les autres substrats ; ceci à l'exception de l'hydroxyéthylcellulose où ctivité s'exprime en unités selon le protocole de COURTOIS et BUI KHAC DIEP (21) près la diminution de viscosité en 30 minutes.

SUBSTRAT	pH DE L'ESSAI	T E T E		POCHE GASTRIQUE		INTESTIN MOYEN		INTESTIN POSTERIEUR	
		A	B	A	B	A	B	A	B
réhalose	5,4	100	6	44,4	28,7	83,3	16,4	100	26,1
accharose	5,2	70,8	1,9	34,7	0	84,72	8,1	80	3,2
midon	5,2	11,1	1,3	4,4	70,4	4,4	1,3	26,8	1,3
ellulose	5,2	0	0	0	0	0	0	0	0
arboxyméthyl cellulose	4,8	28,6	12,4	16,7	13,2	17,3	15,3	24,2	16,1
émicellulose B 7	5,2	0	34,6	2	61,5	5,32	42,5	4,1	50,1
lucomannane	5,2	47,7	30,1	0	46,8	4,5	34,6	3	39,1
aminarine	5,2	92	40,6	0	35,2	0,9	46	33	25,7
ectine	4,8	18,6	13,7	56,8	10,7	11,5	15,7	56,8	8,3
ydroxyéthyl-cellulose	5,2	3000 U/gr	0	7800 U/gr	0	3850 U/gr	4000 U/gr	7850 U/gr	0

DISCUSSION DES RESULTATS

L'examen d'ensemble des résultats obtenus (tableau n° IX) permet de conclure à la présence d'une très grande variété d'osidases chez la larve de Rhagium inquisitor.

Cette richesse en enzymes hydrolysant les constituants glucidiques a été signalée régulièrement par tous les auteurs qui ont étudié l'équipement enzymatique des Insectes xylophages (DEBRIS, THUILLIER, LE FAY).

Dans le cadre des oligosaccharidases, nous nous sommes limitée à la recherche des activités invertasique et tréhalasique, qui toutes deux ont été mises en évidence.

Par ailleurs, l'insecte possède une très grande variété d'enzymes capables de scinder différents polysaccharides.

Une forte activité amylasique se retrouve essentiellement dans la préparation B de poche gastrique. Il s'agirait donc d'une enzyme intracellulaire.

Aucune activité sur la cellulose gonflée insoluble n'a pu être décelée dans les différents extraits. Par contre, les dérivés substitués et solubles de la cellulose : carboxyméthylcellulose et hydroxyéthylcellulose

sont dégradés. L'activité hydrolytique vis-à-vis de la carboxyméthylcellulose se répartit régulièrement tout au long du tube digestif. L'hydroxyéthylcellulose est préférentiellement attaquée par les préparations A contenant les enzymes directement extractibles. Par ailleurs, les pH optimums d'activité sont légèrement différents (pH 4,8 pour la carboxyméthylcellulose et pH 5,2 pour l'hydroxyéthylcellulose). Comme pour la plupart des autres Insectes xylophages étudiés, Rhagium inquisitor se montre incapable d'hydrolyser la cellulose insoluble alors qu'il attaque ses dérivés solubles. Il apparaît donc que ces deux types de substrats sont hydrolysés par deux groupes d'enzymes distincts ; les cellulases agissant sur les substrats insolubles et les β (1 ⟶ 4) glucosanases d'ANDERSON et Coll. (3).

L'hémicellulose B 7 contenant 20 % d'une glucuronoaraboxylane, 45 % d'une glucomannane et 4 à 5 % d'une glucuronoarabogalactane est partiellement hydrolysée par les préparations B, avec libération de glucose et de mannose.

La glucomannane est hydrolysée avec libération de glucose et mannose. Tout comme pour l'activité hémicellulasique, les enzymes se retrouvent dans les préparations B.

La laminarine est une β (1 ⟶ 3) glucane similaire à la callose, polysaccharide insoluble qui oblitère les

tubes criblés en les mettant hors service. Les extraits de tête manifestent une activité hydrolysante très accentuée sur la laminarine. Il est permis de se demander si la salive du Rhagium ne facilite pas le percement des galeries au niveau des tubes criblés oblitérés. Les enzymes dépolymérisant les $\beta(1 \longrightarrow 3)$ glucanes peuvent en outre présenter un intérêt nutritionnel en fournissant du glucose.

L'insecte renferme aussi comme tous les autres xylophages étudiés une action dépolymérisante accentuée sur la pectine. Ces pectinases ont été l'objet d'une étude plus approfondie, exposée dans le chapitre suivant.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE L'ACTIVITE POLYGALACTURONASIQUE

-o-o-o-o-o-o-o-

ETUDE DE L'ACTIVITE PECTINASIQUE DU TUBE DIGESTIF

DE RHAGIUM INQUISITOR

Les polygalacturonases ou polygalacturonaside glycanohydrolases (E-C-3-2-1-15) hydrolysent les glycosides $\alpha(1 \longrightarrow 4)$ du squelette polygalacturonique des pectines ou des acides pectiques avec libération selon le type d'enzymes, soit d'acides oligogalacturoniques, soit d'acide monogalacturonique.

La première polygalacturonase fut découverte par BOURQUELOT et HERISSEY (6) dans l'Orge germée.

Puis ce type d'enzyme s'est révélé largement répandu et en particulier chez les microorganismes.

Les travaux sur ces enzymes isolées à partir de sources différentes ont montré que celles-ci étaient nombreuses et variables selon leur origine.

Le terme de "polygalacturonase" désignerait alors plusieurs enzymes distinctes et le problème de leur classification s'est posé.

Trois systèmes de classification ont été proposés. SCHUBERT (89) a élaboré un système de classification suivant le pH optimum et distingue trois groupes : β pectine glycosidase agissant à pH 3,5, α -pectine glycosidase à pH 5,5

et β-pectine glycosidase à pH 7.

Il a proposé de remplacer le terme "polygalacturonase" par "glycosidase", car ces enzymes attaquent la liaison glycosidique entre deux unités galacturoniques ; puis DEMAIN et PHAFF (39) à la suite de travaux plus récents préconisent deux divisions au sein des polygalacturonases :

1) les enzymes attaquant la molécule au hasard et libérant des acides oligogalacturoniques jusqu'à l'acide digalacturonique (Endopolygalacturonases).

2) Les enzymes dont la base est l'attaque terminale de la molécule avec libération uniquement d'acide galacturonique (Exopolygalacturonases).

DEUEL et STUTZ (42) ont élaboré un système plus simple. Ils ont classé les polygalacturonases en trois groupes dont le premier englobe toute polygalacturonase attaquant l'acide pectique et libérant des polyuronides.

Le deuxième, contient les enzymes qui libèrent des polyuronides à partir de pectines méthylées.

Le troisième renferme les enzymes attaquant l'extrémité terminale de la molécule avec libération d'acide mono-galacturonique.

C'est la classification de DEMAIN et PHAFF qui sera utilisée de préférence car elle permet toujours l'insertion de nouvelles polygalacturonases.

Certaines enzymes attaquant la molécule d'acide pectique avec libération, non plus d'acide galacturonique mais d'acide déhydrogalacturonique, provenant d'une trans-élimination sur l'acide galacturonique (45) (8).

Les polygalacturonases sont largement répandues parmi les microorganismes qui, d'ailleurs, sécrètent un mélange d'enzymes pectinolytiques. C'est ainsi que MILL a pu isoler à partir de cultures d'Aspergillus niger : une endopolygalacturonase (69) et deux exopolygalacturonases (70) (71). Par ailleurs, REXOVA (85) a pu séparer à partir de cultures d'Aspergillus niger, une endopolygalacturonase, une polyméthylgalacturonase et une pectinestérase. Les travaux d'ENDO (46) ont aussi abouti à l'isolement de trois endopolygalacturonases et une exopolygalacturonase chez Coniothyrium diplodiella. Plus récemment, une endopoly-galacturonase fut séparée d'une galactanase dans des cultures de Phytophtora infestans (17).

Chez les végétaux supérieurs, ce type d'enzyme semble moins répandu. Une exopolygalacturonase a cependant pu être isolée de la Carotte (54) et de la Tomate (55).

Les travaux sur les enzymes pectinolytiques d'Insectes sont beaucoup plus rares. Ces enzymes sont localisées le plus souvent dans les glandes salivaires.

DEBRIS (36), lors de l'étude de l'équipement en osidases de différents insectes xylophages et phytophages, a montré que plusieurs d'entre eux possédaient une forte activité pectinasique.

Ces insectes possédant le plus souvent une flore microbienne associée, l'activité polygalacturonasique peut provenir soit de l'insecte lui-même, soit des micro-organismes.

LE FAY (61) a retrouvé une activité chez des micro-organismes isolés d'un insecte xylophage, Ips sexdentatus. Mais, après inhibition de la flore intestinale par des antibiotiques, l'activité est retrouvée à peu près inchangée, ce qui tendrait à montrer que l'insecte est capable d'élaborer lui-même l'enzyme.

Par ailleurs, chez Pyrrhocoris apterus, Insecte phytophage exempt de flore microbienne associée (47) (30), FOGLIETTI a pu isoler une activité exopolygalacturonasique.

D'une façon générale, les pectinases semblent plus actives chez les insectes xylophages. COURTOIS a émis l'hypothèse que l'enzyme présente dans la salive leur permettrait de creuser des galeries dans le bois (28).

Lors de l'étude de quatre espèces d'Aphidiens MAC ALEAN et CAMERON (65) ont montré qu'il s'agissait d'une pectine-

polygalacturonase. LAUREMA et NUORTEVA confirmèrent ces résultats (58) (75).

ADAMS et MAC ALLAN (2) (1) (64) ont retrouvé une activité polygalacturonasique dans la salive de plusieurs espèces d'Aphidiens et pensent que l'activité polygalacturonasique de leur salive les aiderait dans leur cheminement à travers la lamelle moyenne pectique.

Cependant l'absence d'activité chez de nombreux insectes phytophages montrerait que celle-ci n'est pas nécessaire à la pénétration intracellulaire.

Seule l'abeille se nourissant essentiellement du nectar qu'elle aspire, ne possède qu'une faible activité pectinasique.

I - Répartition de l'activité polygalacturonasique chez Rhagium inquisitor

Nous avons retrouvé une activité polygalacturonasique tout au long du tube digestif de la larve avec cependant un maximum d'activité au niveau de la poche gastrique et de l'intestin postérieur, et ce, surtout dans les extraits (A) (tableau N° X). COURTOIS avait déjà observé chez les larves de Capnodis miliaris (24) un maximum d'activité au niveau de la partie antérieure de l'insecte, contenant les glandes salivaires.

Pour la suite de nos essais, nous avons utilisé les extraits de poche gastrique.

Cette recherche de l'activité polygalacturonasique a été effectuée en prenant la pectine comme substrat.

Lors d'essais suivants, nous avons constaté que les extraits enzymatiques étaient plus actifs sur l'acide pectique que sur la pectine. C'est pourquoi nous avons abandonné cette dernière au profit de l'acide pectique.

T A B L E A U N° X

REPARTITION DE L'ACTIVITE PECTINASIQUE LE LONG DU TUBE DIGESTIF DE LA LARVE DE RHAGIUM INQUISITOR

Essais à pH 4,8 et à + 37° pendant cinq jours. Les chiffres du tableau correspondent au pourcentage d'hydrolyse du substrat. La concentration du substrat dans le milieu est 2,5 mg.

	% respectif par rapport au poids total de l'insecte	Extrait (A)	Extrait (B)
Tête	9,5	18,62	13,7
Poche gastrique	3,7	56,8	10,7
Intestin moyen	28	11,52	15,68
Intestin postérieur	24	56,8	8,3

II - Détermination du pH optimum

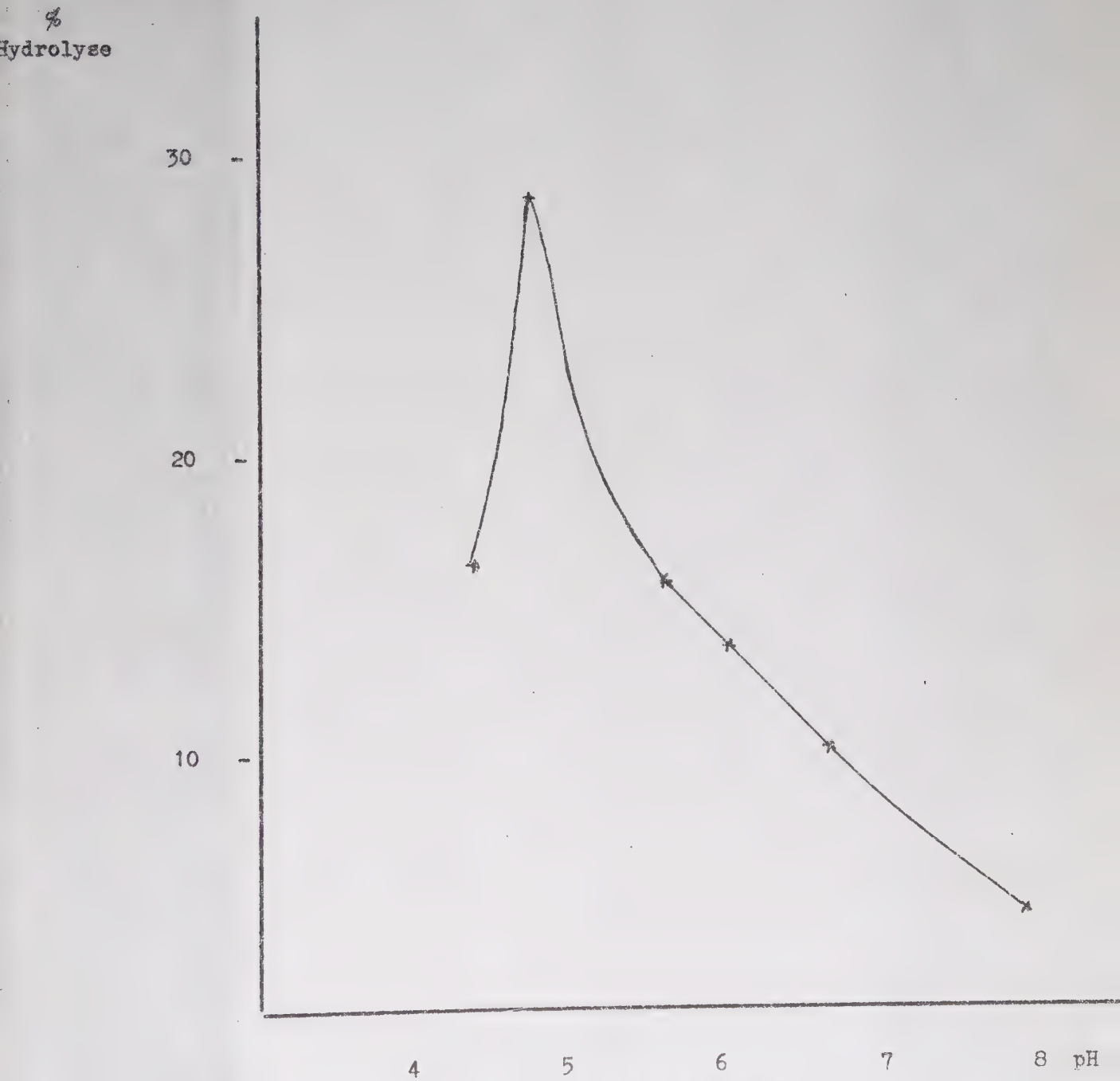
L'activité enzymatique déterminée pour différentes valeurs de pH montre quelques divergences selon qu'il s'agit de l'extrait (A) ou de l'extrait (B).

L'extrait (A) de poche gastrique ne montre qu'un optimum d'activité entre pH 5,05 et 5,4, alors que l'extrait (B) montre deux optimums, l'un à pH 5,05 et l'autre à pH 5,75, ce qui serait en faveur de la présence de deux types d'enzymes dans cet extrait.

Cette double activité polygalacturonasique viendrait corroborer l'hypothèse de COURTOIS selon laquelle certains insectes tels que Ips acuminatus (27) (22) posséderaient deux enzymes différentes :

- l'une élaborée par l'insecte et présente dans la fraction directement extractible.

- l'autre, d'origine bactérienne, solubilisée par gels et dégels.



F I G U R E n° 10

HYDROLYSE DE L'ACIDE PECTIQUE EN FONCTION DU pH

PAR L'EXTRAIT (A) DE LARVES ENTIERES

Substrat 2,5 mg dans le milieu ; 0,5 ml de préparation enzymatique,

réagissant cinq jours à + 37°.

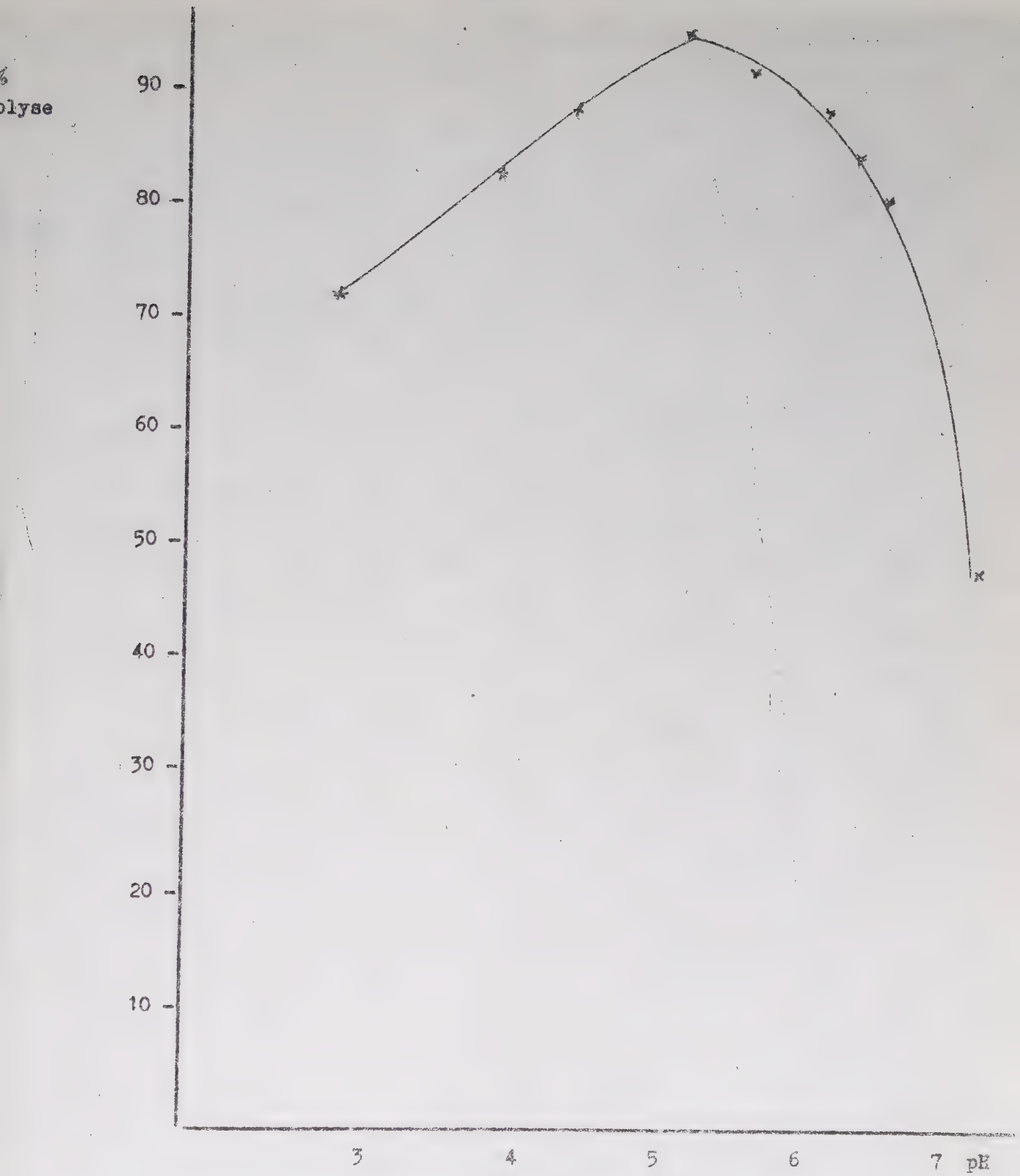
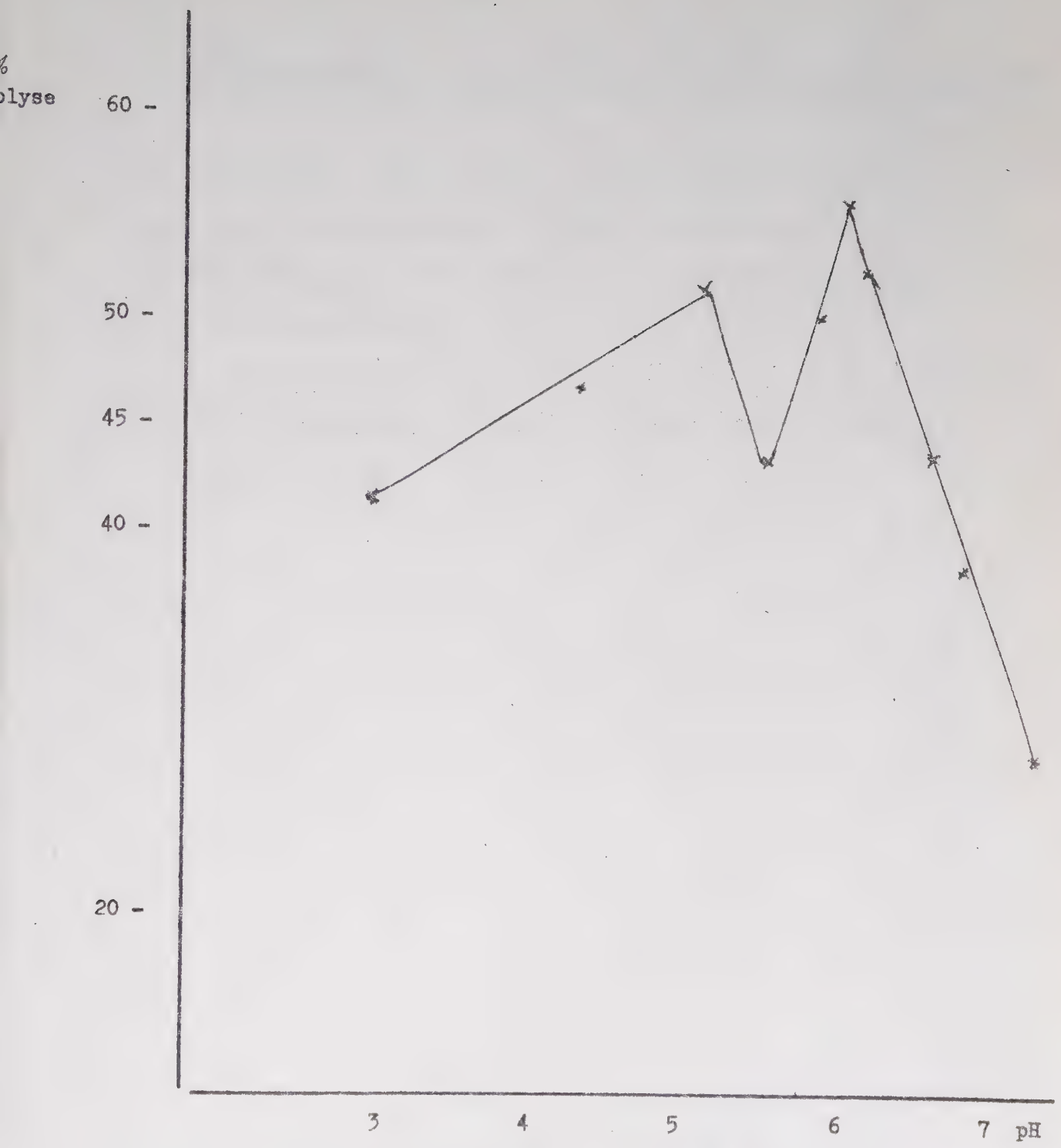


FIGURE n° 11

HYDROLYSE DE L'ACIDE PECTIQUE EN FONCTION DU pH

PAR L'EXTRAIT (A) DE POCHE GASTRIQUE

Substrat 2,5 mg dans le milieu ; 0,5 ml de préparation enzymatique réagissant 24 heures à + 37°.



F I G U R E n° 12

HYDROLYSE DE L'ACIDE PECTIQUE EN FONCTION DU pH

PAR L'EXTRAIT (B) DE POCHE GASTRIQUE

Substrat 2,5 mg dans le milieu ; 0,5 ml de préparation enzymatique réagissant
24 heures à 4 37°

III - Préparation d'un extrait enrichi en polygalacturonase

Pour la suite de nos essais, nous avons effectué un fractionnement sommaire des protéines des extraits de poche gastrique afin d'obtenir une fraction enrichie en polygalacturonase.

La fraction obtenue entre 30 et 40 % de saturation en sulfate d'ammonium s'avère la plus active vis-à-vis de l'acide pectique.

IV - Inactivation thermique

La résistance de l'enzyme à différentes températures a été étudiée. Nous avons utilisé l'extrait (A) de poche gastrique après précipitation entre 30 et 40 % de saturation en sulfate d'ammonium. Après une heure à + 30° et à + 37°, aucune inactivation ne se produit ; de même à + 40° et + 50°. Ce n'est qu'à + 60° et après 20 minutes d'incubation que l'enzyme est totalement inactivée.

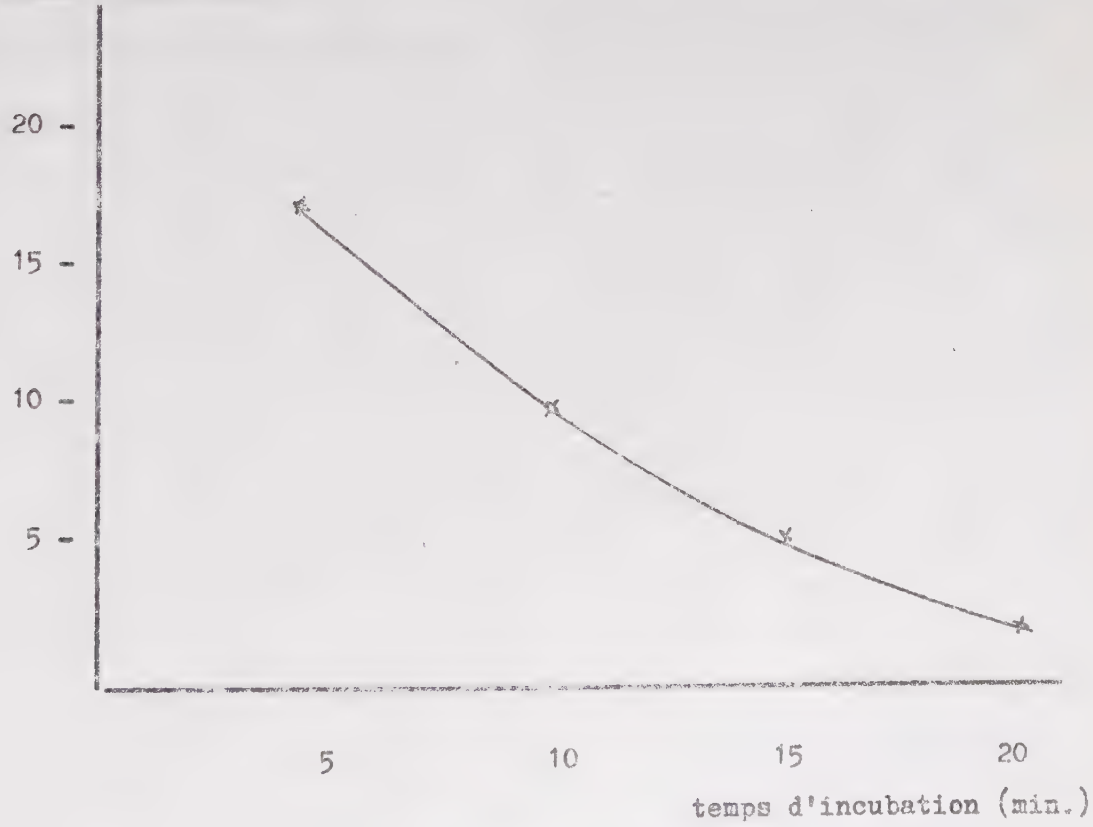


FIGURE n° 13

INACTIVATION DE LA POLYGALACTURONASE A + 60°

V - Spécificité vis-à-vis de différents substrats

Nous avons étudié l'activité hydrolytique des extraits (A) et (B) de poche gastrique sur différents substrats :

- pectine
- acide pectique
- acide pectique réduit

Les deux enzymes se sont révélées plus actives sur l'acide pectique que sur la pectine.

Il s'agirait donc de polygalacturonases plutôt que de polyméthylgalacturonases qui elles, agiraient préférentiellement sur la pectine.

Par contre, leur action sur l'acide pectique réduit est pratiquement nulle, ce qui indiquerait que, comme avec l'enzyme de Pyrrhocoris apterus (47), l'attaque de la molécule d'acide pectique se ferait à partir de son extrémité réductrice.

Par ailleurs, la composition des hydrolysats se révèle différente selon qu'il s'agit de l'extrait (A) ou de l'extrait (B) :

- présence d'acide galacturonique seul pour (A)
- présence d'acides mono- et digalacturoniques pour (B)

Ceci viendrait confirmer l'existence de deux enzymes différentes dans les extraits (A) et (B) ; enzymes dont nous

avons tenté d'élucider le mode d'action par analyse chromatographique, sur papier, des hydrolysats d'acide pectique et d'oligomères de l'acide D-galacturonique.

MODE D'ACTION

A - EXTRAIT (A)

1) Acide pectique

Dès le début de l'hydrolyse, l'acide monogalacturonique est seul détecté comme produit final. Ce n'est qu'après une hydrolyse prolongée qu'apparaissent des acides oligogalacturoniques qui, par la suite, seront eux aussi dégradés en acide monogalacturonique.

Cela indique que l'enzyme agit en libérant par recurrence les molécules d'acide galacturonique terminales.

2) Acides oligogalacturoniques

L'acide tétragalacturonique, dès le début de l'hydrolyse donne lieu à l'apparition d'acides mono- et trigalacturoniques. Puis, au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse, il y a apparition de quantités croissantes d'acides di et monogalacturoniques. Le dimère finissant par disparaître au profit de l'acide monogalacturonique, retrouvé seul en fin d'hydrolyse (tableau N° XI).

La formation des acides tri et monogalacturoniques dès le début de l'hydrolyse du tétramère indique bien que l'enzyme l'attaque avec libération d'une molécule d'acide galacturonique terminale. S'il y avait coupure au milieu de la chaîne, il y aurait libération au début de l'hydrolyse, d'acide digalacturonique seul.

Avec l'acide trigalacturonique, il y a apparition simultanée d'acides mono et digalacturoniques, celui-ci finissant par disparaître au profit de l'acide monogalacturonique, retrouvé seul en fin d'hydrolyse (tableau N° XII).

L'acide digalacturonique est hydrolysé complètement en acide monogalacturonique (tableau N° XIII).

T A B L E A U N° XI

CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACIDE TETRAGALACTURONIQUE

PAR L'EXTRAIT (A)

Temps d'hydrolyse en heures	Acides oligogalacturoniques			
	Tétra	Tri	D i	Mono
1	++++	++	-	+
2	+++	++	+	++
6	+	+	++	+++
24	-	-	-	++++

T A B L E A U N° XII

CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACIDE TRIGALACTURONIQUE

PAR L'EXTRAIT (A)

Temps d'hydrolyse en heures	Acides oligogalacturoniques		
	Tri	D i	Mono
1	++++	+	+
2	+++	++	++
4	++	+++	+++
6	+	++	++++
24	-	-	++++

T A B L E A U N° XIII

CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACIDE DIGALACTURONIQUE

PAR L'EXTRAIT (A)

Temps d'hydrolyse en heures	Acides oligogalacturoniques	
	Di	Mono
1	++++	+
2	+++	++
4	++	+++
6	+	++++
24	-	+++++

B - EXTRAIT (B)

1) Acide pectique

Comme avec l'enzyme de l'extrait (A), le premier produit décelé dans les hydrolysats d'acide pectique est l'acide monogalacturonique.

Après une hydrolyse prolongée, apparaissent les acides oligogalacturoniques mais, contrairement à ce qui a été observé pour la préparation (A), ces oligomères ne sont pas totalement dégradés. Il coexiste toujours les acides mono- et digalacturoniques même après une longue durée de contact et de nouveaux apports d'extrait enzymatique.

2) Acides oligogalacturoniques

L'acide tétragalacturonique, au début de l'hydrolyse, donne naissance aux acides tri- et monogalacturoniques. Puis, alors que le trimère disparaît, il apparaît des quantités croissantes d'acides mono- et digalacturoniques. Là encore, même après une hydrolyse prolongée, coexistent toujours les acides mono- et digalacturoniques (tableau N° XIV).

L'acide trigalacturonique est hydrolysé en acide mono- et digalacturonique (tableau N° XV).

Enfin, l'acide diglacturonique n'est pratiquement pas hydrolysé (tableau N° XVI).

T A B L E A U N° XIV

CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACIDE TETRAGALACTURONIQUE PAR L'EXTRAIT (B)

Temps d'hydrolyse	Acides oligogalacturoniques			
	Tétra	Tri	D i	Mono
1 heure	+++++	±	-	±
2 heures	++++	+	-	+
6 heures	+++	++	±	++
24 heures	++	+++	+	+++
48 heures	+	++	++	++++
5 jours	0	±	+++	+++++
6 jours	0	0	++++	+++++

T A B L E A U N° XV

CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACIDE TRIGALACTURONIQUE

PAR L'EXTRAIT (B)

Temps d'hydrolyse en heures	Acides oligogalacturoniques		
	Tri	D i	Mono
1	++++		
2	+++	+	+
4	++	++	++
6	+	+++	+++
24	0	++++	++++
48	0	+++++	+++++

T A B L E A U N° XVI

CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACIDE DIGALACTURONIQUE

PAR L'EXTRAIT (B)

Temps d'hydrolyse en heures	Acides oligogalacturoniques	
	Di	Mono
1	++++	0
2	++++	0
4	++++	0
6	++++	0
24	++++	traces
48	++++	traces

La présence constante de l'acide digalacturonique dans les hydrolysats obtenus avec l'extrait (B) nous a permis d'envisager différentes possibilités d'action pour cette enzyme :

a) Inhibition par l'acide galacturonique se formant au début de l'hydrolyse du substrat ;

b) Transfert d'une molécule d'acide galacturonique sur une autre molécule d'acide galacturonique acceptrice.

c) Si ces deux hypothèses n'étaient pas confirmées, l'enzyme serait incapable d'hydrolyser l'acide digalacturonique et nécessiterait la présence d'un minimum de trois molécules d'acide galacturonique dans le substrat pour que son activité se développe.

a) Essais d'inhibition

Aucun effet inhibiteur n'a pu être observé lorsque de l'acide galacturonique (1 à 10 mM) est ajouté au milieu d'incubation.

b) Activité transférante

Depuis les expériences de RABATE (83), de nombreuses réactions biochimiques de transfert d'oses ont pu être mises

en évidence, les donateurs utilisés étant des holosides et les accepteurs des alcools acycliques, des oses ou holosides.

En particulier, le méthanol est un accepteur précieux pour l'étude des transferts car les hétérosides du méthanol sont en général très lentement hydrolysés par les osidases et de ce fait, seront assez facilement décelables dans le milieu de réaction.

Nous avons donc tenté de mettre en évidence une activité transférante de l'enzyme en utilisant le méthanol comme accepteur et l'acide trigalacturonique comme donateur d'unité galacturonique. Si cette hypothèse était vérifiée, il se formerait de l' α méthyl D-galacturonoside, non réducteur.

Nous avons effectué l'hydrolyse de l'acide trigalacturonique en présence de méthanol à une concentration de 20 % dans le milieu. Parallèlement, un essai est effectué en l'absence de méthanol.

Après des durées d'incubation de 0 à 5 jours, nous effectuons une chromatographie des deux milieux de réaction. A tout moment, la composition des hydrolysats s'est révélée identique (présence d'acides mono- et digalacturoniques).

Les deux premières hypothèses n'ayant pu être confirmées, il semblerait que l'enzyme de l'extrait (B) soit une poly-

galacturonase, incapable d'hydrolyser l'acide digalacturonique donc, nécessitant la présence d'au moins deux liaisons galacturonosidiques dans le substrat pour que son activité se développe.

DISCUSSION DES RESULTATS

L'ensemble des résultats semble pouvoir permettre de conclure à l'existence de deux enzymes différentes selon qu'il s'agit de l'extrait (A) ou de l'extrait (B).

L'enzyme de l'extrait (A) serait une exopolygalacturonase.

Le mode d'action sur l'acide pectique et les oligomères de l'acide galacturonique peuvent être rapprochés de ceux observés par MILL (70), lors de l'étude d'une exopolygalacturonase d'Aspergillus niger.

Par ailleurs, l'enzyme procède à partir de l'extrémité réductrice de la molécule d'acide pectique, mode d'attaque inverse de celui de nombreuses polysaccharidases qui attaquent la chaîne à partir de l'extrémité non réductrice.

Ce mode d'attaque a été retrouvé pour la polygalacturonase d'Erwinia carotovora (72) ainsi que chez un autre insecte, Pyrrhocoris apterus (47) (30).

L'enzyme de l'extrait (B) semble légèrement différent.

Ce serait aussi une exopolygalacturonase procédant à partir de l'extrémité réductrice de l'acide pectique mais incapable d'hydrolyser l'acide digalacturonique.

HATANAKA et OZAWA (54) ont signalé chez Erwinia aroideae une exopolygalacturonase, non seulement incapable d'hydrolyser l'acide digalacturonique, mais procédant à l'attaque de l'acide pectique en libérant non pas de l'acide monogalacturonique, mais de l'acide digalacturonique.

Ce n'est pas cependant le cas de l'enzyme de l'extrait (B) qui hydrolyse bien l'acide pectique avec libération d'acide monogalacturonique, mais qui nécessiterait pour son action la présence d'au moins deux liaisons galacturonosidiques successives dans le substrat pour que son activité se manifeste.

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS

-o-o-o-o-o-

Contrairement aux Insectes xylophages parasites des Conifères en sève étudiées précédemment, les larves de Rhagium inquisitor effectuent leur nutrition sur des bois de Conifères abattus (Pinus sylvestris) jusqu'au stade de leur complète dégradation.

Au début de leur évolution, les larves se nourrissent dans les faisceaux du liber riches en glucides solubles, puis au fur et à mesure de leur évolution, le bois, l'écorce et les faisceaux du liber sont le siège de fermentations et d'une décomposition qui ne perturbent en rien la nutrition des larves.

Cette nutrition à partir des biotopes dégradés est favorisée par les diverses enzymes du tube digestif puisque nous trouvons des activités assez élevées sur divers substrats.

Rhagium inquisitor possède une très grande variété d'osidases et en particulier, de polysaccharidases attaquant les glucides constitutifs du bois (cellulose, hémicellulose, substances pectiques). Un tel équipement enzymatique a été régulièrement signalé par tous les auteurs qui ont étudié les enzymes des insectes xylophages (13) (25) (29) (59) (92).

Rhagium inquisitor s'est révélé capable d'hydrolyser le saccharose et le tréhalose. L'hydrolyse du tréhalose a d'ailleurs été régulièrement signalée lors de l'étude des xylophages ; la tréhalase étant une enzyme essentielle du métabolisme glucidique chez les Insectes.

Des enzymes capables d'hydrolyser différents polysaccharides et en particulier les glucides constitutifs du bois (celluloses, hémicelluloses, substances pectiques), sont présentes.

L'amidon est principalement hydrolysé par les extraits (B) de poche gastrique. Cette activité amylasique n'est d'ailleurs pas spécifique des xylophages et a été retrouvée chez les phytophages.

Les extraits de tête manifestent une activité marquée vis-à-vis de la laminarine, β (1 $\longrightarrow$ 3) glucane similaire à la callose obturant les tubes criblés du bois. La salive de la larve pourrait ainsi faciliter le percement des galeries au niveau de ces tubes criblés obturés. En outre, l'activité dépolymérisante vis-à-vis des β (1 $\longrightarrow$ 3) glucanes peut présenter un intérêt nutritionnel en fournissant du glucose.

L'activité pectinasique est toujours nette tout au long du tube digestif mais avec une prédominance au niveau

des glandes salivaires. Chez la larve d'un autre xylophage, Capnodis miliaris, COURTOIS (28) avait déjà signalé que cette enzyme était beaucoup plus abondante dans la partie antérieure de l'insecte (tête et glandes salivaires) que dans la partie postérieure. Il pense que, plutôt que de jouer un rôle dans la nutrition, la pectinase des xylophages leur permettrait de creuser leurs galeries en dissociant les cellules du bois.

Par ailleurs, chez Rhagium inquisitor, nous avons pu déceler deux activités exopolygalacturonasiques différentes, l'une dans l'extrait (A) et l'autre dans l'extrait (B). Ceci viendrait corroborer l'hypothèse de COURTOIS selon laquelle certains Insectes tels que Ips acuminatus (27) (22) posséderaient deux enzymes différentes : l'une élaborée par l'insecte et présente dans la fraction directement extractible ; l'autre, d'origine bactérienne solubilisée par gels et dégels.

Aucune activité hydrolysante vis-à-vis de la cellulose gonflée n'a pu être décelée. Ce substrat n'est d'ailleurs attaqué que très rarement par les xylophages. DEBRIS n'a décelé une activité cellulasique que chez les adultes de Pissodes notatus et chez les larves de Capnodis miliaris (36).

Cette activité serait due à la présence de levures

dans le tube digestif. Mais ces insectes n'ont cependant pas pu être élevés sur cellulose pure, ce qui montre que, malgré la présence de levures, il est difficile d'admettre la digestion de la cellulose par les xylophages.

Pour sa part, DESCHAMPS, par une méthodé colorimétrique, avait observé une faible activité cellulasique chez Rhagium inquisitor.

Comme avec les préparations des autres xylophages étudiés, les dérivés solubles de la cellulose (CMC et HEC) sont attaqués par les extraits de Rhagium inquisitor.

Ces résultats viendraient confirmer l'hypothèse de WHITAKER (97) et SELBY (90) selon laquelle la cellulose native serait attaquée par les cellulases et les dérivés solubles par des $\beta(1 \longrightarrow 4)$ glucosanases.

Il ressort de cette étude que les larves de Rhagium inquisitor possèdent un large éventail d'osidases lui permettant d'attaquer les différents constituants du bois, à l'exception de la cellulose native.

Cet équipement enzymatique est dans l'ensemble comparable à celui retrouvé chez les autres xylophages étudiés, bien que ces derniers parasitent non pas les bois morts, mais les sujets physiologiquement sains.

CONCLUSIONS GENERALES

-o-o-o-o-o-

L'étude de l'équipement en osidases des différentes parties du tube digestif des larves de Rhagium inquisitor a montré que :

- L'insecte possède une grande variété d'enzymes agissant sur les oligosaccharides et les polysaccharides.

- Chaque enzyme se répartit préférentiellement, soit dans l'extrait (A) représentant l'extrait aqueux direct, correspondant aux enzymes extracellulaires ou diffusant très facilement, soit dans l'extrait (B) obtenu après une série de congélations et décongélations successives et correspondant aux enzymes intracellulaires, provenant vraisemblablement d'inclusions cytoplasmiques.

En ce qui concerne les oligosaccharides, nous avons mis en évidence une tréhalase et une invertase. Ces deux enzymes ont leur activité maximum dans les extraits (A) de tête et d'intestin.

Les polysaccharidases sont largement distribuées tout au long du tube digestif soit dans l'extrait (A), soit dans l'extrait (B) selon l'enzyme envisagée.

L'amidon est nettement hydrolysé par l'extrait (B) de poche gastrique. L'activité amylasique présente deux pH optimums d'activité : l'un à pH 5,2 - 5,4, l'autre à pH 6 - 6,2

ce qui serait en faveur de la présence de deux types d'enzymes.

Les activités sur différents substrats cellulosiques se sont révélées différentes.

La cellulose gonflée n'est pas attaquée. Il semble bien d'ailleurs que ce substrat ne soit que très rarement hydrolysé par les insectes xylophages (13) (28) (60) (94).

Par contre, les dérivés solubles de la cellulose (CMC, HEC) sont dégradés. L'activité sur la CMC semble uniformément répartie tout au long du tube digestif de la larve, et cela dans les deux extraits (A) et (B). L'activité sur l'HEC, par contre, est surtout localisée dans les extraits (A) des différentes parties du tube digestif.

Ces résultats viendraient appuyer la thèse de WHITAKER et SELBY selon laquelle la cellulose native serait attaquée par les cellulases et ses dérivés solubles par les $\beta(1 \longrightarrow 4)$ glucosanases, sans toutefois apporter d'indications nettes sur la participation des $\beta(1 \longrightarrow 4)$ glucosanases à l'attaque du bois.

L'hémicellulose B 7 est hydrolysée par les extraits (B) des différentes parties du tube digestif avec libération de glucose et de mannose. Par ailleurs, les différents extraits (B) hydrolysent la glucomannane, ce qui semblerait en faveur de l'identité des deux activités enzymatiques.

L'activité sur la laminarine β(1 ⟶ 3) glucane similaire à la callose est assez régulièrement répartie tout au long du corps de la larve, dans les extraits (B). Cependant les extraits (A) de tête manifestent une très forte activité hydrolysante sur ce polysaccharide et il est permis de penser que peut-être la salive de l'insecte facilite le percemént de galeries au niveau des tubes criblés obturés par la callose.

L'insecte renferme en outre comme tous les autres xylophages étudiés une action dépolymérisante accentuée sur les substances pectiques. Cette activité pectinasique a été retrouvée dans les différentes parties du tube digestif mais est surtout localisée au niveau de la poche gastrique et des glandes salivaires.

Deux types d'enzymes ont pu être mis en évidence ; tous deux attaquent préférentiellement l'acide pectique à la pectine. L'enzyme directement extractible par l'eau est une exopolygalacturonase procédant à partir des extrémités réductrices des chaînes d'acide pectique qu'elle hydrolyse en acide monogalacturonique. L'enzyme solubilisée à partir des éléments particulaires dégrade lui aussi l'acide pectique en procédant à partir des extrémités réductrices des chaînes. Mais elle est incapable d'hydrolyser l'acide digalacturonique.

Il semble qu'à l'exception de la cellulose native, l'équipement en osidases de son tube digestif permette à la larve de Rhagium inquisitor d'attaquer les différents substrats qui constituent sa nourriture habituelle.

La majorité des osidases se retrouve dans les extraits (A) donc ces enzymes sont en grande partie extracellulaires ou tout au moins à l'état libre dans les cellules.

Les activités enzymatiques diverses ont été retrouvées tout au long du tube digestif. Cependant, celles-ci sont en général plus élevées dans la partie antérieure (poche gastrique, intestin moyen) où s'effectue la digestion. Il semble que les activités retrouvées dans la partie postérieure ne soient que le reflet d'un transit des secrétions vers cette zone. Histologiquement, nous n'avons pas pu observer de processus de secrétion indiquant l'élaboration d'enzymes dans la partie postérieure du tube digestif.

BIBLIOGRAPHIE

-o-o-o-

1 - ADAMS (J.B.) et MAC ALLAN (J.W.)
Canad. J. Zool., 1956, 34, 541

2 - ADAMS (J.B.) et MAC ALLAN (J.W.)
Canad. J. Zool., 1958, 36, 305

3 - ANDERSON (F.B.), CUNNINGHAM (W.L.) et MANNERS (D.J.)
Bioch. J., 1964, 90, 30

4 - AUCLAIR (J.L.)
Ann. Rev. Entomol., 1963, 8, 439

5 - BERTRAND (G.) et THOMAS (P.)
in "Guide pour les manipulations de chimie biologique".
Dunod et Pinot Eds, Paris, 1913.

6 - BOURQUELOT (E.) et HERISSEY (H.)
J. Pharm. Chim., 1898, 8, 49

7 - BRAMSTEDT (F.)
Naturf., 1948, 3 b, 14

8 - BUSH (D.A.) et CODNER (R.C.)
Phytochem., 1970, 9, 87

9 - CHARARAS (C.)
Rev. Path. Végét. Ent. Agric. France, 1956, 35, 114

10 - CHARARAS (C.)
in "Etude Anatomique et Biologique de quelques Curculionidae et Scolytidae Xylophages". Le François, Ed.
Paris, 1957.

11 - CHARARAS (C.)
in "Etude Biologique des Scolytidae des Conifères"
Le Chevalier Ed., Paris, 1962, p. 556.

12 - CHARARAS (C.), COURTOIS (J.E.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1962, 255, 2001

13 - CHARARAS (C.), COURTOIS (J.E.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 383

14 - CHARARAS (C.), COURTOIS (J.E.) et LAURANT-HUBE (H.)
Ann. Pharm. Fr., 1967, 25, 257

15 - CHARPENTIER (M.)
Thèse Doct. Etat Pharm., Paris, 1965

16 - CHAUVIN (P.)
in "Physiologie de l'insecte" (Instit. Nat. Rech. Agronomiques, Paris, 1941).

17 - COLE (A.L.S.)
Phytochem., 1970, 9, 337

18 - CONCHIE (J.), HAY (A.J.) et LEVY (G.A.)
Biochem. J., 1961, 79, 324

19 - COURTOIS (J.E.) et BUI KHAC DIEP
Ann. Pharm. Fr., 1965, 23, 649

20 - COURTOIS (J.E.) et BUI KHAC DIEP
Ann. Pharm. Fr., 1965, 23, 705

21 - COURTOIS (J.E.) et BUI KHAC DIEP
Ann. Pharm. Fr., 1967, 25, 181

22 - COURTOIS (J.E.) et CHARARAS (C.)
Holz und Organismen
Internationales Symposium Berlin-Dahlem 1965

23 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 698

24 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)
Ann. Pharm. Fr., 1964, 22, 629

25 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)
C.R. Soc. Biol., 1964, 158, 1038

26 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.) et DEBRIS (M.M.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1964, 258, 4148

27 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)
Ann. Pharm. Fr., 1964, 22,549

28 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)
Actes du Symposium International de Chimie et Bioch. de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses de Grenoble. Imprimeries Réunies, Chambéry Ed.,1964,p.127

29 - COURTOIS (J.E.), CHARARAS (C.), DEBRIS (M.M.) et LAURANT-HUBE (H.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 2219

30 - COURTOIS (J.E.), PERCHERON (F.) et FOGLIETTI (M.J.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1968, 266, 164

31 - COURTOIS (J.E.), PETEK (F.) et KOLAHI-ZANOUZI (M.A.)
C.R. Soc. Biol., 1962, 156, 565

32 - DAHLQVIST (A.)
Acta Chem. Scand., 1960, 14, 63

33 - DAJOZ (R.)
in "Ecologie et Biologie des Coléoptères xylophages de la hêtraie". Vie et milieu Ed., 1966, p. 527

34 - DALOUL (M.S.)
Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1963

35 - DAY (M.F.) et WATERHOUSE (D.F.)
in "Insect physiology". Roeder K.D. Ed. Willy New-York, 1953, p. 311.

36 - DEBRIS (M.M.)
Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1964

37 - DEBRIS (M.M.), CHARARAS (C.) et COURTOIS (J.E.)
C.R. Soc. Biol., 1964, 158, 1241

38 - DELLA BEFFA (G.)
in "Gli insetti dannosi all Agricoltura". Ulrico Hoepli Ed., Milan, 1961

39 - DEMAIN (A.L.) et PHAFF (H.J.)
Wallerstein Lab. Commun., 1957, 20, 119

40 - DEMELIER (J.F.), BARK (C.), LABAT (J.) et COURTOIS (J.E.)
Clinical Enzymology, 1969, 2, 187

41 - DESCHAMPS (P.)
Ann. Sci. Nat. Zool., 1953, 11e série, 449

42 - DEVEL (H.) et STUTZ (E.)
Advances in Enzymol., 1958, 20, 341

43 - DISCHE (Z.)
Bioch. J., 1927, 189, 77

44 - DUSPIVA (F.)
Mitt. Biol. Zentralanst, Berlin-Dahlem, 1954, 80, 155

45 - EDSTROM (R.D.) et PHAFF (H.J.)
J. Biol. Chem., 1964, 239, 2403

46 - ENDO (A.)
Agr. Biol. Chem., 1961, 25, 394

47 - FOGLIETTI (M.J.)
Thèse Doct. Etat Pharm. Paris, 1967

48 - FOGLIETTI (M.J.) et PERCHERON (F.)
Carbohydr. Res., 1968, 7, 146

49 - FRAENKEL (G.)
J. Expt. Biol., 1940, 17, 18

50 - FREREJACQUE (M.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1941, 213, 88

51 - GILMOUR (D.)
in "Biochemistry of Insects", Acad. Press Ed.,
New-York-London, 1961

52 - GRASSE (P.)
in "Rôle des flagellés symbiotiques chez les Blattes et les Termites". Union Internat. Sci. Biol., Série B, 1952, 10, 70

53 - HALLIWELL (G.)
Bioch. J., 1958, 68, 605

54 - HATANAKA (C.) et OZAWA (J.)
Agr. Biol. Chem., 1964, 28, 627

55 - HOBSON (G.E.)
Bioch. J., 1964, 92, 324

56 - IWASAKI (T.), TOKUYASU (K.) et FUNATSU (M.)
J. Biochem. Japon, 1964, 55, 30

57 - KALF (G.F.) et RIEDER (S.V.)
J. Biol. Chem., 1958, 230, 691

58 - LAUREMA (S.) et NUORTEVA (P.)
Ann. Entomol. fenn., 1961, 27, 89

59 - LE FAY (A.)
Thèse Doct. Etat Pharm., Paris, 1969

60 - LE FAY (A.), COURTOIS (J.E.) et THUILLIER (A.)
Ann. Inst. Pasteur, 1970, 119, 483

61 - LE FAY (A.), COURTOIS (J.E.), THUILLIER (A.), CHARARAS (C.) et LAMBIN (S.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1969, 268, 2968

62 - LE FAY (A.), THUILLIER (A.), CHARARAS (C.), COURTOIS (J.E.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1969, 268, 3130

63 - LISON (L.)
Bull. Sci. Acad. Roy. Belg., 1937, 5e série, XXIII, 317

64 - MAC ALLAN (J.W.) et ADAMS (J.B.)
Canad. J. Zool., 1961, 39, 305

65 - MAC ALLAN (J.W.) et CAMERON (M.L.)
Canad. J. Zool., 1956, 34, 559

66 - Mc CREADY (R.M.)
in "Methods in Carbohydr. Chemistry". WHISTLER (R.L.)
et WOLFROM (M.L.) Eds Acad. Press, 1963, 2, 27

67 - Mc CREADY (R.M.)
in "Methods in Carbohydr. Chemistry", WHISTLER (R.L.)
et WOLFROM (M.L.) Eds, Acad. Press, 1965, 5, 168

68 - MARCUS (B.A.)
Zeitsch. für Morphologie und Oekol der Tiere", 1930,XIX

69 - MILL (P.J.)
Bioch. J., 1966, 99, 557

70 - MILL (P.J.)
Bioch. J., 1966, 99, 562

71 - MILL (P.J.) et TUTTOBELLO (R.)
Bioch. J., 1961, 79, 57

72 - NASUNO (S.) et STARR (M.P.)
J. Biol. Chem., 1966, 241, 5298

73 - NELSON (N.)
J. Biol. Chem., 1944, 153, 375

74 - NORMAN (A.G.)
Bioch. J;, 1936, 30, 1135

75 - NUORTEVA (P.)
Ann. Entomol. Fenn., 1958, 24, 89

76 - PAQUIN (R.)
Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1962

77 - PARTRIDGE (S.M.)
Nature, 1949, 164, 443

78 - PAZUR (J.H.) et ANDO (T.)
J. Biol. Chem., 1960, 235, 297

79 - PAZUR (J.H.) et KLEPPE (K.)
J. Biol. Chem., 1962, 237, 1002

80 - PETEK (F.)
Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris, 1962

81 - PHILIPS (E.F.)
J. Agr. Research, 1927, 35, 385

82 - POLL (M.)
Contribution à l'étude des tubes de Malpighi des Coléoptères. Leur utilité en phylogénèse. Rech. Inst. Torley-Rousseau, 1932, IV, 1

83 - RABATE (J.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, 17, 572

84 - REESE (E.T.) et GILLIGAN (W.)
Arch. Biochem. Biophys., 1953, 45, 74

85 - REXOVA'-BENKOVA' (L.), SLEZA'RIK (A.)
Coll.Gzech. Chem. Commun., 1966, 31, 122

86 - ROUDIER (A.J.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1493

87 - ROUDIER (A.J.)
Bull. Soc. Chim. France, 1961, 976

88 - ROUDIER (A.J.) et EBERHARD (L.)
Bull. Soc. Chim. France, 1960, 2074

89 - SCHUBERT (E.)
Helv. Chim. Acta, 1954, 37, 691

90 - SELBY (K.), MAITLAND (C.C.) et THOMPSON (K.V.A.)
Bioch. J., 1963, 86, 98

91 - SOMOGYI (M.)
J. Biol. Chem., 1945, 160, 69

92 - THUILLIER (A.)
Thèse Doct. Etat Pharm. Paris, 1966

93 - THUILLIER (A.), CHARARAS (C.) et COURTOIS (J.E.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 1966, 262, 2757

94 - THUILLIER (A.), COURTOIS (J.E.) et CHARARAS (C.)
"Biochimica Applicata", 1967, 14, 1

95 - THUILLIER (A.), LAMBIN (S.), COURTOIS (J.E.) et CHARARAS (C.)
Ann. Inst. Pasteur, 1967, 113, 97

96 - VOGEL (B.)
Z. Vergleich Physiol., 1931, 14, 273

97 - WHITAKER (D.R.)
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 1701

98 - WIGGLESWORTH (V.B.)
Bioch. J., 1927, 21, 797

99 - WIGGLESWORTH (V.B.)
Bioch. J., 1931, 22, 150

100 - WIGGLESWORTH (V.B.)
in "Princips of Insect Physiology", Acad. Press, London, 1939

101 - ZAMENHOF (S.)
in "Methods in Enzymology", COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.) Eds Acad. Press. New-York, 1957, 3, 734

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

MATERIEL ET METHODES

PROTOCOLE DES ESSAIS 8

A - PREPARATION DES SUBSTRATS 8

I - OLIGOSACCHARIDES 8

1) Oligomères de l'acide galacturonique 8

2) Acide mucique 11

II - POLYSACCHARIDES 11

1) Pectine 12

2) Acide pectique 12

3) Acide pectique réduit 13

4) Glucomannane 14

5) Laminarine 15

6) Amidon 15

7) Cellulose gonflée 16

8) Carboxyméthylcellulose sodique ou blanose (C.M.C.) 16

9) Hydroxyéthylcellulose 16

10) Hémicellulose 17

Pages

B - PREPARATIONS ENZYMATIQUES 18

C - PROTOCOLE OPERATOIRE 21

I - COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL 21

II - PROPORTIONS RELATIVES TAMPON-ENZYME 22

III - pH ET TEMPERATURE 22

IV - DETERMINATION DU POUVOIR REDUCTEUR 22

D - TECHNIQUES ANALYTIQUES 23

I - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER 23

II - HYDROLYSE CHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES 27

III - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE 27

IV - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES 28

V - DOSAGE DES PROTEINES 29

VI - MESURE DE VISCOSITE 33

DEUXIEME PARTIE

ETUDE ANATOMO-PHYSIOLOGIQUE DU TUBE DIGESTIF DE LA LARVE DE RHAGIUM INQUISITOR

A - LE TUBE DIGESTIF 37

I - METHODOLOGIE 37

II - ETUDE ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DU TUBE DIGESTIF 39

B - LA SYMBIOSE 44

TROISIEME PARTIE

EQUIPEMENT ENZYMATIQUE DU TUBE DIGESTIF

LES ENZYMES DE RHAGIUM INQUISITOR 52

Pages

ETUDE DE LA REPARTITION DES DIFFERENTES OSIDASES ET POLYSACCHARIDASES CHEZ RHAGIUM INQUISITOR 54

CHAPITRE I

ENZYMES AGISSANT SUR LES OLIGOSACCHARIDES ET HETEROSIDES 56

GLUCOSIDASES E.C. (3-2-1-20) 56

I - TRÉHALASE E.C. (3-2-1-28) 57

II - INVERTASE E.C. (3-2-1-26) 61

CHAPITRE II

ENZYMES AGISSANT SUR LES POLYSACCHARIDES 64

I - AMYLASES E.C. (3-2-1-1) 64

II - CELLULASES E.C. (3-2-1-4) 71

1) Cellulose gonflée 73

2) Carboxyméthylcellulose 73

3) Hydroxyéthylcellulose 76

III - HEMICELLULASES 81

IV - GLUCOMANNANE 84

V - LAMINARINASE 85

VI - PECTINASE 86

DISCUSSION DES RESULTATS 89

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE L'ACTIVITE POLYGALACTURONASIQUE

ETUDE DE L'ACTIVITE PECTINASIQUE DU TUBE DIGESTIF DE RHAGIUM INQUISITOR 93

Pages

I - Répartition de l'activité polygalacturonasique chez Rhagium inquisitor 98

II - Détermination du pH optimum 100

III - Préparation d'un extrait enrichi en polygalacturonase 104

IV - Inactivation thermique 105

V - Spécificité vis-à-vis de différents substrats ... 106

MODE D'ACTION

A - EXTRAIT (A) 107

1) Acide pectique 107

2) Acides oligogalacturoniques 112

a) Essais d'inhibition 116

b) Activité transférante 116

DISCUSSION DES RESULTATS 118

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS 120

CONCLUSIONS GENERALES 124

BIBLIOGRAPHIE 128

TABLE DES MATIERES 138

-o-o-o-o-o-o-